



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI



Facultat de  
Química  
Tarragona

# IMPORTÀNCIA I APLICACIONS DE L'ADN NO HUMÀ EN L'ÀMBIT FORENSE

---

TREBALL DE FI DE MÀSTER EN GENÈTICA,  
FÍSICA I QUÍMICA FORENSE

**JOSEP TURON ADELL**

Lloc de pràctiques: Laboratori d'EMATSA

Nom del tutor al lloc de pràctiques: Joan Bové

Nom del tutor de la URV: Antoni Romeu



## Agraïments

Després d'un intens període de nou mesos, avui és el dia: escric aquest apartat d'agraïments per a finalitzar el meu treball de fi de màster. Ha estat un període d'aprenentatge profund, no només en el camp científic, sinó també a nivell personal.

Escriure aquest treball ha tingut gran impacte en mi i és per això que m'agradaria agrair a totes aquelles persones que m'han ajudat i recolzat durant aquest procés.

Primer de tot, m'agradaria mencionar als meus companys de pràctiques en EMATSA, per la seva col·laboració, especialment a Joan Bové per guiar-me durant l'estada a l'empresa com a tutor.

A més a més, també vull donar les gràcies al tutor i coordinador del màster en la URV, Antoni Romeu, per la seva preuada ajuda.

Definitivament m'heu proporcionat tots els instruments necessaris per a completar el meu treball de fi de màster satisfactòriament.

També m'agradaria agrair als meus familiars els seus savis consells i la seva comprensió. Sempre heu estat aquí per a mi.

Moltes gràcies a tots!

# Índex del treball

Índex del treball .....	3
Resum.....	5
Abstract .....	5
1. INTRODUCCIÓ .....	6
1.1. Empresa on s'ha realitzat el treball .....	6
1.2. ADN no humà i genètica forense.....	7
2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	12
3. METODOLOGIA .....	13
3.1 STRs canins.....	13
3.1.1. Recollida de mostres .....	13
3.1.2. Preparació de les mostres .....	14
3.1.3. Extracció i purificació .....	14
3.1.4. Quantificació d'ADN total.....	15
3.1.5. Preparació de la placa per a la PCR.....	15
3.1.6. Preparació de la placa per a l'electroforesi .....	16
3.1.7. Software: Gennemapper.....	17
3.1.8. Validació de l'analista .....	19
3.1.9. Software: Kit canino.....	22
3.1.10. Comparació dels perfils per l'analista .....	24
3.2. Detecció i quantificació per qPCR de <i>Legionella</i> spp i <i>Legionella pneumophila</i> .....	27
3.2.1. Extracció i purificació .....	27
3.2.2. Software: QuantStudio 3.....	27
3.2.3. Preparació de la placa per a la PCR.....	28
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	30
4.1. STRs canins.....	30

4.2. Detecció i quantificació per qPCR de legionel·la spp i Legionella pneumophila.....	32
4.3. Propostes de futur .....	34
5. CONCLUSIONS .....	35
6. BIBLIOGRAFIA.....	36
7. ANNEX .....	38

Abreviatures:

CSV: *comma-separated values*

EMATSA: Empresa Municipal Mixta d'Aigües de Tarragona

ENAC: Entidad Nacional de Acreditación

LR: *likelihood ratio*

PBS: *phosphate buffered saline*

PCR: *polymerase chain reaction*

PHR: *peak height ratio*

PNA: procediment normalitzat d'anàlisi

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

RFU: *relative fluorescence units*

STR: *short tandem repeats*

MIP: *macrophage infectivity potentiator*

ISAG: *International Society for Animal Genetics*

## **Resum**

Aquest treball té com a objectiu revelar diversos usos forenses de mostres d'ADN no humà a l'hora que combina aquests fonaments en la realització de pràctiques en una empresa externa a la URV, com és el laboratori d'EMATSA. En el seu contingut es fa un primer repàs a l'estructura teòrica sobre la utilització del ADN no humà en un context forense, seguit de les aplicacions reals que s'ha desenvolupat en l'empresa.

Aquest document té un fort contingut metodològic, on s'expliquen els processos mitjançant els quals s'arriba a determinar els resultats dels diferents anàlisis. L'estada al laboratori té una càrrega important en l'aprenentatge, per tot el que comporten els anàlisis de material genètic com per l'aplicació dels criteris de qualitat que té el laboratori d'EMATSA, per tal d'estar acreditat per ENAC en l'execució dels seus anàlisis.

## **Abstract**

This project has the objective of reveal several forensic uses of non-human DNA samples at the time that combines these fundamentals in the realization of internship in an company external to the URV, such as EMATSA laboratory's. In this document, a first review is made of the theoretical structure on the use of non-human DNA in a forensic context, followed by the actual applications that have been developed in the company.

This document has a strong methodological content, which explains the processes through which it possible to determinate the results of the different analyzes. The stay in the laboratory has an important load in the learning process, for all that involves the analysis of genètic material as for the application of the quality criteria that has EMATSA laboratory's, in order to be accredited by ENAC in the execution of their analyzes.

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. Empresa on s'ha realitzat el treball

L'empresa en la qual s'han realitzat les pràctiques i s'ha desenvolupat aquest treball de fi de màster ha estat en EMATSA, concretament al laboratori.

L'empresa EMATSA (Empresa Municipal Mixta d'Aigües de Tarragona) està dedicada a la gestió del cicle integral de l'aigua en els termes municipals de Tarragona i La Canonja. Presta, a més, serveis d'enginyeria de projectes, execució d'obra hidràulica, gestió de vials públics, i servei de laboratori extern.

El laboratori d'aquesta empresa (<https://www.lab.ematsa.cat/>), està dividit en diferents seccions:

- 1) Secció de biologia: es desenvolupen tasques d'extracció, d'amplificació i seqüenciació d'ADN. També s'hi realitzen observacions microscòpiques, entre d'altres anàlisis. Aquí es on s'han realitzat les 180 hores de pràctiques.
- 2) Secció de microcontaminants orgànics i inorgànics, equipada amb cromatògrafs de gasos. En aquesta secció podríem trobar elements de la química forense, com és el cas de la determinació d'estupefaents.
- 3) Secció de microbiologia: on realitzen anàlisis microbiològics com cultius bacterians, identificació de microorganismes en mostres d'aigua etc...
- 4) Secció de físic-químic ambiental: on s'analitzen paràmetres de mostres d'aigua residual i residus
- 5) Secció de físic-químic de potables: on s'analitzen aigües de xarxa i depòsits.
- 6) Zona de mostreig: es on es du a terme la presa i gestió de les mostres que entren al laboratori.
- 7) Zona de recepció: secció d'administració i recepció de mostres, elaboració d'ofertes a clients. S'anoten les mostres i es donen d'alta al sistema, proporcionant un codi únic i inequívoc a cada mostra.

Un cop mencionada l'empresa i ubicats en el laboratori, es presenten breument les activitats que s'han desenvolupat.

Tot i que l'estada s'ha centrat bàsicament en l'estudi dels STR canins, també s'han realitzat deteccions i quantificacions de legionel·la mitjançant qPCR.

En l'estudi dels marcadors genètics canins la metodologia de treball es pot resumir en 5 etapes:

1. Extracció i purificació
2. Amplificació
3. Seqüenciació
4. Interpretació dels perfils genètics
5. Comparació o *match*

Aquest estudi es realitza en 2 matrius diferents. Per una banda es tenen els frotis bucalis o mostres indubitades, i per l'altra banda les mostres de femta o forenses.

També es va participar en l'estudi de la tècnica de detecció i quantificació de legionel·la *spp* i *Legionella pneumophila* mitjançant qPCR. A més a més, en aquesta part es va redactar un PNA referent al *software* de creació del *template* de PCR i en l'actualització de les PNAs existents referents a la part metodològica d'extracció, purificació i amplificació. Es tracta d'unes metodologies que estaven en *stand-by* i es va aprofitar l'estada de pràctiques per a reactivar-ho.

## **1.2. ADN no humà i genètica forense**

Si bé la gran majoria de la tipificació d'ADN forense realitzada per a investigacions criminals involucra ADN humà, no és l'única font d'ADN que pot ser útil per a demostra la culpabilitat o la innocència d'un individu sospitós d'un delicte (Sensabaugh i Kaye, 1998).

El primer informe sobre l'estudi d'ADN no humà en ciència forense data de fa 25 anys. Aquell informe no va ser tingut en molta consideració, i tot i que va ser útil en la resolució del cas, a nivell forense va ser poc rellevant. En canvi, ara ha esdevingut una font d'informació completament normalitzada en casos que van des de la violació i l'assassinat com la infracció de patents i atacs de

gossos. Aquests últims precisament són el motiu pel qual es comencen a estudiar els STRs dels gossos (Iyengar i Hadi, 2013).

Segons la Universitat de Vermont (2007) l'ADN no humà té una rellevància important a l'hora d'abordar casos forenses. L'ADN animal pot ser utilitzat per a ubicar un sospitós en una escena determinada, per a connectar víctima i sospitós i per a connectar el cos de la víctima en una escena del crim diferent.

Generar elements per poder connectar sospitosos i víctimes resulta essencial a l'hora d'esclarir un cas criminal. Per a poder analitzar correctament les proves, es necessita d'una metodologia específica. Gràcies a la realització de l'estudi de Halverson i Basten (2005), aquestes dues qüestions queden resoltes, ja que es centren en l'estudi d'evidències en casos forenses per a crear eines per poder enllaçar els sospitosos amb les seves víctimes.

Pel que fa als tipus d'investigacions, i matrius d'estudi que poden aportar informació, els autors Iyengar i Hadi (2013) identifiquen:

- Assassinats/segrestos: anàlisi d'STR d'ADN animal, anàlisi d'ADNm animal, anàlisi d'ADN viral, anàlisi d'ADN de sòls.
- Epidemiologia
- Infraccions de patents
- Atacs d'animals
- Drogues
- altres

El genoma caní està format per 38 parells d'autosomes i els cromosomes XY sexuals. En l'estudi d'aquests STRs s'utilitza l'ADN genòmic tot i que també pot ser estudiat l'ADNm, concretament les dues zones hipervariables. En aquest camp s'ha centrat l'estudi de Wetton, Higgs, Spriggs, Roney, Tsag i Foster (2003). Aquest ADN és recuperat de mostres de pèls de gos.

L'estudi més important pel que fa als STRs canins és el realitzat per Kanthaswamy (2009) en el qual es desenvolupa i es valida un panell d'STRs canins estandarditzats per a l'ús en casos forenses. Gràcies a aquest estudi,

s'obre la porta a poder iniciar aquest mètode amb resultats fiables, contrastables per altres laboratoris i a poder ser motiu de l'obtenció d'acreditacions.

Centrant-nos més en l'ADN caní, l'Universitat de Vermont (2007) coincideix en que els pèls deixats pels animals, poden ajudar a resoldre casos, ja que es tracta d'un element fàcilment transferible, transportable i difícil de veure a ull nu.

Iyebgar i Hadi (2013) afegeixen que els pèls són l'evidència majoritària, amb l'addició de matrius com la femta, l'orina i la saliva.

Aquests elements s'agruparien en tres tipus de prova: l'animal com a testimoni, l'animal com a víctima o com a perpetrador.

Referent a atacs de gossos, s'han arribat a utilitzar sets de STRs de 10 repeticions dinucleòtids per ajudar en la investigació de morts animals il·legals i en un atac que va resultar en la mort d'un nen de 7 anys (Padar, Angyal, Egyed, Furedi, Woller, Zoldag i Fekete, 2001 i Padar, Egyed, Kontadakis, Furedi, Woller, Zoldag i Fekete, 2002, citats en Barmard Health Care, 2015).

Finalment, per a acabar amb el tema dels STRs canins, cal mencionar que Meyers-Wallen (2001) adopta una visió de futur en el seu estudi, on resumeix que l'estudi de l'ADN caní pot ser utilitzada per a categoritzar neoplàsties i predir quins fàrmacs podrien ser exitosos en causar remissió, utilitzar la medicina canina per a realitzar avenços en estudis humans etc...

A més a més, el mateix autor afirma que la informació que podria aportar el projecte genoma caní pot ser utilitzada per a resoldre problemes no mèdics, com ara proveir d'una empremta digital genètica d'un gos amb el propòsit d'identificació o certificació de paternitat. També remarca la possibilitat d'identificar races mitjançant polimorfismes en els gens, així com beneficis per a la medicina en gossos individuals o en poblacions canines.

Des de fa uns anys, l'estudi d'aquests STR també ha sortit del món forense per a englobar qüestions de parentesc i puresa de les races en viviers americans (Denise, Johnston, Halverson, Marshall, Rosenfed, McKenna, Sharp i Edwards, 2003).

Existeixen també estudis que es centren en la variació fenotípica i l'alta incidència en malalties hereditàries de gossos domèstics com ara el treball de Neff, Broman, Mellersh, Ray, Acland, Aguirre, Ziegle, Ostrander i Rine (1998). En aquest document utilitzen les característiques mencionades anteriorment per a complementar els anàlisis genètics en humans i ratolins.

L'estudi de Menotti-Raymon, David, Stephens, Lyons i O'Brien (1997) recull l'estudi de diferents STR de felins amb l'objectiu d'individualitzar genèticament gats domèstics per aplicacions forenses. La metodologia del treball és molt similar a la utilitzada al laboratori d'EMATSA, ja que segueixen un patró semblant a l'hora d'assignar els *bins* i crear una base de dades.

Gràcies a aquest estudi, es deriva el de Schmitz, Bleckmann i Mürtz (1997), en el qual gràcies al pelatge d'un gat domèstic s'aconsegueix implicar un sospitós d'assassinat mitjançant l'estudi d'STRs i posterior comparació dels perfils genètics.

Més enllà de l'aclariment de casos penals, l'ADN no humà també pot ser utilitzat en contra de la caça furtiva. És el cas de l'estudi portat a terme per Caniglia, Fabbri, Greco, Galaverni i Randi (2009) en el qual s'identifica un assassí en sèrie de llops, el qual porta un penjoll amb diferents dents d'animal, les quals seran comparades amb els cossos dels llops.

Últimament també s'han utilitzat amb interès forense el peix Piracatinga (*Callophysius macropterus*) per a localitzar i identificar restes humanes trobades al Riu Amazones (Jennigs Simões, 2017). Gràcies a aquests peixos necròfags, es poden recuperar elements amb material genètic, que amb l'adient amplificació de l'ADNm permet certificar la defunció d'individus els quals no s'han pogut trobar els cossos un cop han caigut a l'aigua.

Per altra banda, l'ADN de plantes també pot tenir aquesta funció de nexa entre sospitós i escena, així com provar que el cos de la víctima ha estat mogut. Finalment també troben una funció en la qual les plantes poc comuns poden restringir una possible zona de recerca.

Fent menció novament en l'ADN de plantes, trobem un estudi on utilitzen aquest ADN per identificar de quina espècie s'han fabricat determinades cordes

relacionades en crims. Així, Dunbar (2005), mitjançant l'ADN pot assignar de quina planta provenen les fibres que conformen les cordes.

L'ADN dels insectes i microorganismes també poden resultar útils per a calcular el temps de defunció, tenint aquests últims també utilitat a l'hora de determinar la puresa de l'aigua.

En l'àmbit de la detecció de microorganismes mitjançant la utilització de l'ADN, concretament *Legionella pneumophila* utilitzant la tècnica d'amplificació PCR, trobem un dels primers estudis amb data de 1991 (Bej, Mahbubani i Atlas, 1991).

A partir de l'anterior estudi, es comença a estudiar no tan sols la detecció de la *Legionella pneumophila*, sinó la discrepància d'aquesta amb altres membres del gènere legionel·la spp. Gràcies a l'aplicació de la PCR a temps real sorgeix l'estudi de Reischl, Linde, Lehn, Landt, Barrat i Wellinghausen (2002), que realitza aquesta detecció-diferenciació entre el gènere al complet o en la espècie concreta.

L'estudi de Wilson, Yen-Lieberman, Reischl, Gordon i Procop (2003) va més enllà i es centra en la detecció de *Legionella pneumophila* mitjançant PCR a temps real per al gen *Mip*, ja que es tracta d'un gen que codifica una proteïna específica del gènere legionel·la spp.

Finalment, en aquest camp, existeix l'estudi de Herpers, Jongh, Zwaluw i Hannen (2003) que es centren en la detecció i diferenciació de legionel·la spp i *Legionella pneumophila* utilitzant PCR a temps real específica dels marcadors 23S-5S.

En l'estudi de la Universitat de Vermont (2007) es menciona l'ús de l'ADN de microorganismes en casos forenses, però anteriorment, en l'estudi de Metzker, Mindell, Xiao-Mei Liu, Ptak, Gibbs i Hillis (2002) va ser el pioner en utilitzar un anàlisi filogenètic en un judici, emprant com a prova la transmissió molecular d'una variant del VIH.

## 2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Una vegada assolits els coneixements teorico-pràctics en el màster, l'objectiu de les pràctiques, en aquest cas, és aplicar aquests coneixements en una empresa dins l'entorn d'ADN no humà.

El present treball es fonamenta amb dos tipus d'hipòtesis:

- a) El tipatge d'ADN caní és un mètode eficaç per a la identificació dels gossos, ja sigui per defecacions a la via pública, agressions, parentescos...
- b) La qPCR és una metodologia que permet detectar i quantificar la legionel·la en mostres més ràpid que el cultiu microbiològic tradicional.

Per tant, com a objectius que es deriven d'aquesta estada a l'empresa EMATSA són:

- Adquirir experiència i habilitats a l'hora de treballar amb mostres d'ADN; i amb poc volum de mostra.
- Utilització d'equips complexos de genètica molecular, com el termociclador de qPCR i el seqüenciador.
- Traslladar els coneixements de genètica forense en un nou entorn
- Estar immers en un laboratori acreditat per ENAC, participant activament en el manteniment d'aquest sistema de qualitat
- Estudi de diferents STR canins, des del moment de la presa de les mostres fins a la comparació amb el *software* dels perfils genètics obtinguts.
- Participació en el desenvolupament i reedició dels PNAs de detecció i quantificació de legionel·la spp i *Legionella pneumophila* mitjançant qPCR
- Metodologies associades a la qPCR amb interpretació de resultats

### 3. METODOLOGIA

En aquest apartat es fa referència a les dues metodologies principalment tractades en l'estada al laboratori, que són:

- Obtenció de perfils genètics canins mitjançant STRs
- Detecció i quantificació del gènere legionel·la mitjançant qPCR

#### 3.1 STRs canins

##### 3.1.1. Recollida de mostres

Des de l'empresa EMATSA, es proporcionen kits que contenen guants, *swabs*, vials amb *magic buffer* (permet conservar la mostra a temperatura ambient), vials buits i pots estèrils de 100ml. D'aquesta manera, es participa des del punt de partida del recorregut, recollint la mostra, fins a arribar als resultats finals.

El protocol d'actuació consisteix en realitzar un frotis bucal al gos, passant el *swab* unes 15 vegades entre l'espai comprés entre les genives superiors i la galta, prenent 2 mostres. Una es conserva amb *magic buffer* a temperatura ambient i l'altra es congela fins el moment de l'extracció.

Pel que fa a les mostres de femta, es seleccionen aquelles que presentin un aspecte compacte, descartant les femtes més fluïdes, ja que són les que menys estrès provoquen en les parets dels tubs digestius, i per tant menys cèl·lules del gos són capaces de dependre. Aquestes mostres es recullen en contenidors de 100ml estèrils a temperatura ambient, intentant recollir-les com més pròxim a la data d'anàlisi millor, ja que hi ha la possibilitat que apareguin fongs.

Un cop arriba la mostra al laboratori, el primer pas es recepcionar-la per donar un codi únic i inequívoc a cada mostra.

El segon pas, seria la conservació de la mostra en el cas que no s'iniciï l'assaig de forma immediata.

### 3.1.2. Preparació de les mostres

Aquest pas consisteix en dipositar l'extrem de la turunda en un tub de microcentrífuga en el cas de les mostres bucals.

Per a les femtes, es mulla la turunda amb el tampó PBS 1x i es frega per la superfície de la femta, ja que és on estaran les cèl·lules, evitant introduir el *swab* a l'interior de la femta, i fent especial incisió amb els plecs que presenti. L'extrem on hi ha el cotó serà col·leccionat amb un tub de microcentrífuga.

### 3.1.3. Extracció i purificació

En aquesta fase s'extreu l'ADN cel·lular i s'eliminen les impureses, brutícies o inhibidors de la PCR que puguin contenir les mostres. Al tractar-se de mostres que provenen de diferents matrius, el principi teòric és el mateix tot i que hi ha algunes variacions.

S'utilitza el kit d'extracció Invitrogen (Thermofisher Scientific) format per 6 solucions (*lysis buffer, lysis enhancer, cleanup buffer, binding buffer, wash buffer, elution buffer*).

El protocol per a mostres de cèl·lules bucals és diferent al protocol de les mostres de femta, ja que al tractar-se de dues matrius diferents, requereixen protocols adaptats.

El procediment d'extracció amb el kit Invitrogen és el següent:

1. Un cop tenim els *swabs* de les dues matrius en tubs de microcentrífuga, es procedeix a afegir els tampons de lisis i a incubar-ho el temps recomanat.
2. Després d'una centrifugació es recull el sobrenedant per a afegir el següent tampó per a netejar-ho d'inhibidors.
3. Es torna a recollir el sobrenedant de la centrifugació i aquesta vegada es diposita en una columna de separació. Els reactius que s'utilitzen en aquesta fase provoquen l'adhesió del ADN a la columna i l'expulsió de la resta de mostra. Finalment s'elueix aquest ADN fixat a la columna i es recull en un tub. El producte resultat d'aquest procés és l'ADN purificat.

#### 3.1.4. Quantificació d'ADN total

Per a determinar si hi ha presència d'ADN o no en les mostres abans de portar-les a la PCR, es realitza una quantificació d'ADN total.

En aquest pas es va utilitzar un fluorímetre Qubit 3.0 juntament amb el kit format pel Qubit Buffer i Qubit Reagent. Primerament es passa un patró per a realitzar una recta de calibratge de dos punts, per a poder determinar la concentració d'ADN total en els extractes. En les mostres de femta analitzades, hi havia major concentració, possiblement degut a la presència de material genètic d'altres fonts (bacteris, plantes).

Segons criteris de qualitat d'ISO 17025, s'han d'omplir registres per garantir la traçabilitat de les mostres. És en aquest punt on comença aquesta traçabilitat de les mostres en els registres, ja que s'ha durant tot el procés analític s'han d'anotar: les mesures realitzades, el lot del kit, data de venciment, validació del control negatiu etc...

#### 3.1.5. Preparació de la placa per a la PCR

Aquest pas consisteix en dissenyar la placa i distribuir les mostres per aquesta. Cal omplir els pous corresponents amb els reactius del kit per PCR, el *Primer Mix* i la *Master Mix*. Posteriorment s'afegeix la mostra, el control positiu i negatiu. En la realització de les pràctiques s'utilitzen dos kits diferents:

El kit *Canine Genotypes Panel 1.1* de LifeTechnologies (Thermofisher) permet l'amplificació de 19 loci: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTTh260, AHTk253, INU005, INU030, Amelogenina, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTTh171 i REN247M23. Aquests marcadors són tots dinucleòtids excepte el FH2054 que és tetranucleòtid.

El kit *Canine Genotypes Panel 2.1* LifeTechnologies (Thermofisher) possibilita l'amplificació de 19 loci: PEZ02, ZFX/Y, PEZ17, FH2017, FH2309, PEZ05, FH2001, FH2328, FH2004, FH2361, PEZ21, FH2054, FH3377, FH2017, FH2088, vWF.X, FH2010, PEZ16 i FH3313. En aquest kit, els marcadors són

tots tetranucleòtids a excepció del marcador vWF.X que presenta repeticions de 5 parells de bases.

El termociclador QuantStudio 3 (Thermofisher) del laboratori permet realitzar qPCR però en aquest procediment es realitza una PCR estàndard per amplificar els fragments d'ADN corresponents als marcadors específics de cada kit.

La preparació de la placa es realitza en una campana d'extracció de flux laminar dotada de llum ultraviolada, on tot el material que s'utilitza en aquest apartat està dipositat, sense poder fer-lo servir per a un altre ús.

Al establir el disseny de la placa, és molt important mirar el registre de l'aparell, ja que en cada PCR el control positiu que ve amb el kit es situa en un pou diferent, per a verificar que l'amplificació en aquella posició sigui correcte.

#### 3.1.6. Preparació de la placa per a l'electroforesi

Un cop el termociclador ha amplificat l'ADN, les mostres es carregaran en una altra placa.

L'aparell utilitzat en aquest cas, *Genetic analyzer 3500* d'Applied Biosystem, pot realitzar anàlisis de fragments o bé una seqüenciació completa. En aquest cas està configurat per a dur a terme un anàlisis de fragments.

Un cop dissenyada la placa, i carregades les mostres juntament amb la formamida (*Hi-D*) i el marcador de pesos molecular GeneScan 500. En aquesta fase es fa ús del *software* DataCollection de l'equip per a assignar els continguts de la placa i les condicions en les quals s'ha de realitzar l'electroforesi.

### 3.1.7. Software: Gennemapper

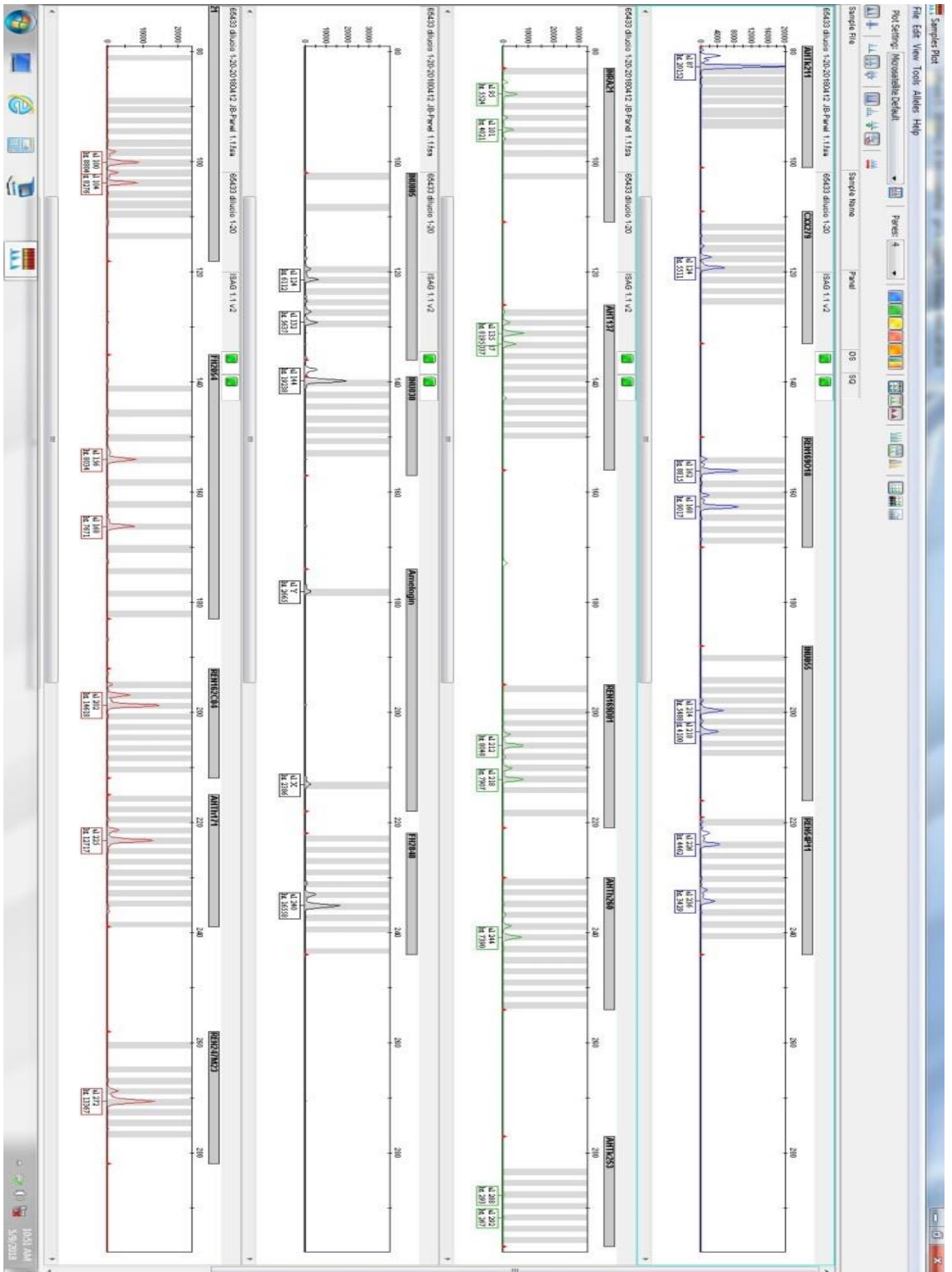
Un cop l'aparell de seqüenciació ha acabat el procés, s'habilita el poder obrir els resultats amb el programa *Gennemapper*, per realitzar l'assignació de pics als corresponents al·lels i obtenir així el perfil genètic de la mostra.

El *software*, mitjançant unes pautes i uns algoritmes establerts, reassignant els pics als al·lels descartant els que poden ser *stutters* o artefactes. Si la relació entre altures és inferior a 50% es considera *stutter*. També descarta aquells que presenten menys de 100 RFUs (llindar analític), o bé considerarà homozigot aquells pics que presenten com a mínim 200 RFUs (llindar estocàstic).

A més a més, hi ha alguns artefactes catalogats que apareixen amb certa regularitat en la mateixa zona i amb intensitats semblants. Aquests, a banda de tenir una forma més ampla, també són identificats pel programa.

En la imatge a continuació s'observa un electroferograma d'una mostra d'un frotis bucal.

De forma general les mostres bucals presenten un millor electroferograma, habitualment perfils complets, amb més pics al·lèlics i de major alçada, mentre que en mostres de femta és més habitual tenir electroferogrames parcials on s'han perdut alguns marcadors degut a la menor qualitat d'ADN.



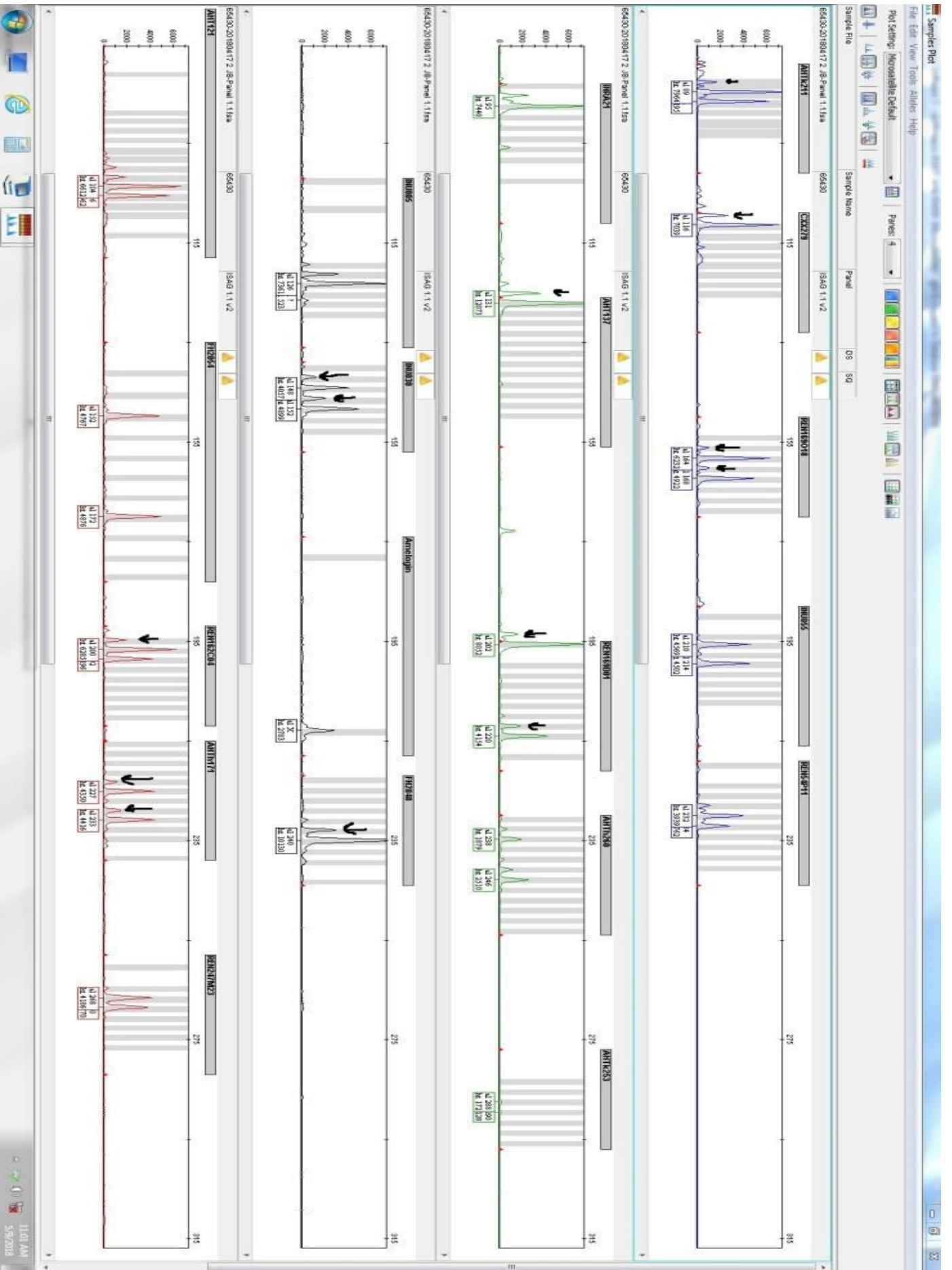
Imatge 1: Mostra de frotis bucal

### 3.1.8. Validació de l'analista

Un cop el *software* ha assignat els al·lels, l'analista ha de fer una revisió acurada per veure si hi ha pics que han estat mal assignats. En aquesta fase, s'ha de comprovar que els pics compleixen aquests requisits:

- Pics assignats amb un mínim de 100 RFUs (heterozigots)
- Pics homozigots amb un mínim de 200 RFUs
- PHR ha d'estar per sobre de 50% en heterozigots
- Identificar *stutters* i artefactes

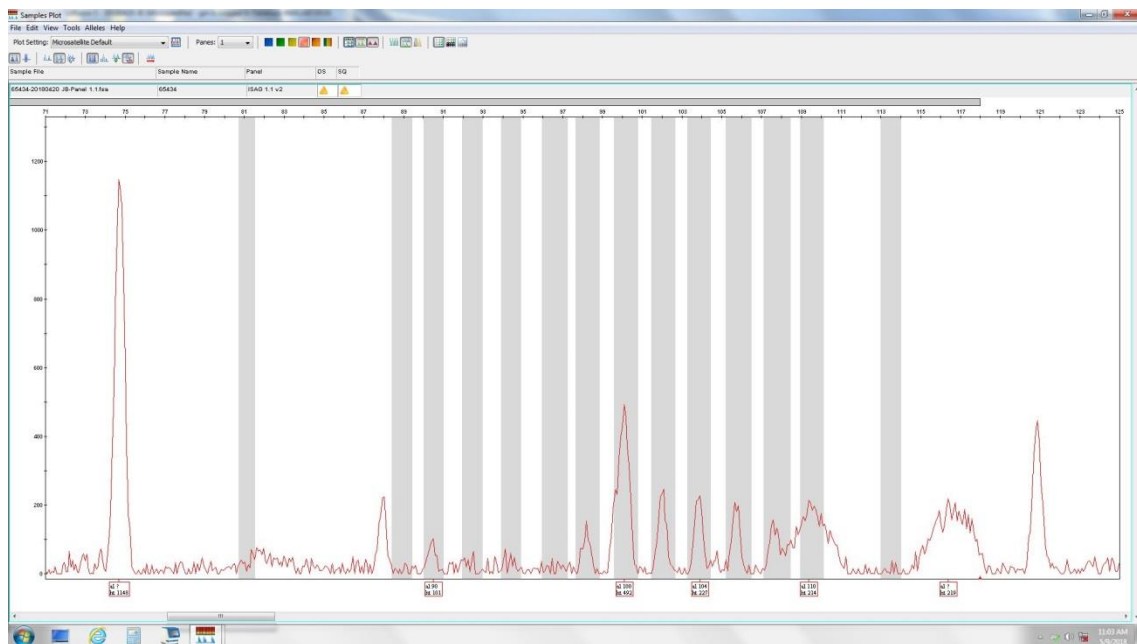
En la següent imatge es pot observar els pics assignats correctament, i els seus *stutters*,



Imatge 2: Frotis bucal amb *stutters* assenyalats

Un dels problemes que també apareixen, més comuns en mostres amb ADN de baixa qualitat, són els pics amb poca altura, soroll de fons i possibles contaminacions de la mostra (perfils mescla). Com a resultat apareix un marcador amb una multiplicitat de pics, en els quals no es pot discernir entre al·lels reals, pics *stutters*, heterozigosi o homozigosi i entre artefactes o contaminació. El resultat és la invalidació d'aquest marcador.

La següent imatge reflecteix aquesta problemàtica habitual en les mostres de ADN de baixa qualitat.



Imatge 3: Mostra de femta en la qual es impossible discernir entre al·lels reals, *stutters* o artefactes

Arribats a aquest punt, disposarem dels perfils d'ADN. Aquests perfils poden ser complets (s'han trobat tots els marcadors) o parcials (si s'ha perdut algun dels marcadors).

Cal dir que el mateix *software* Genemapper fa la normalització d'aquests perfils per poder comparar-los amb resultats d'altres laboratoris segons nomenclatura ISAG.

Al final d'aquesta etapa s'obté:

- Perfil cèl·lules bucal <15+1 (amelogenina) marcadors amplificats: es rebutja el perfil. Cal repetir l'anàlisi o recollir de nou la mostra

- Perfil cèl·lules bucals >15+1 (amelogenina) marcadors amplificats: s'inclou a la base de dades poblacional
- Perfil femta <10+1 (amelogenina) marcadors amplificats: no concloent
- Perfil femta >10+1 (amelogenina) marcadors amplificats: es passa al Kit Canino.

Hi ha marcadors grans que són de més de 200 parells de bases i és més fàcil que es degradin en comparació amb els petits (100 parells de bases), cosa que provoca que no compleixin amb els criteris de qualitats establerts pel laboratori i que es descarti el marcador en qüestió. Un excés d'aquests marcadors descartats pot ocasionar que la mostra no es pugui tirar endavant si no compleix amb el mínim de marcadors establerts per la norma.

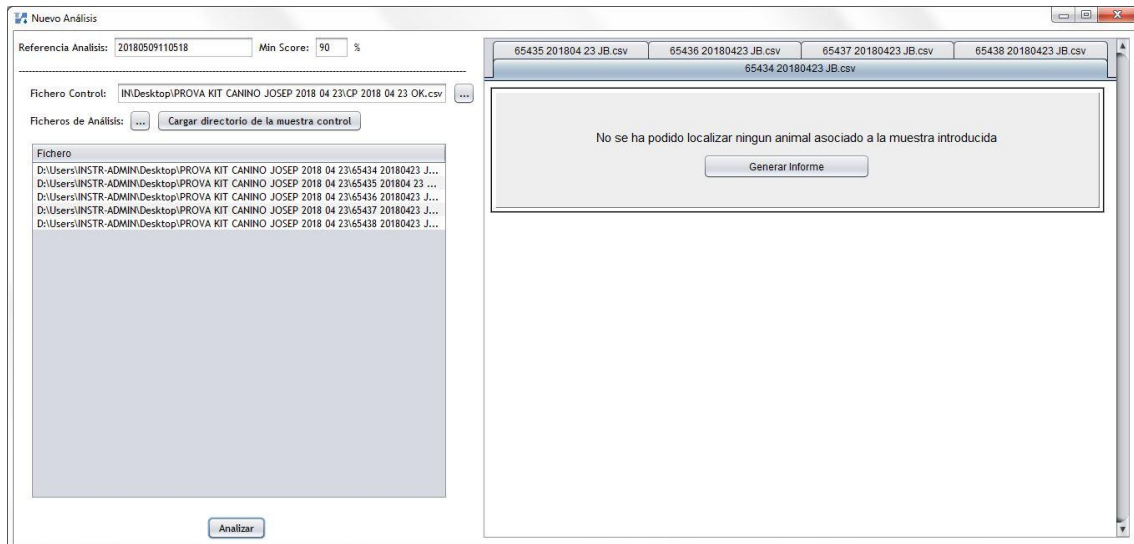
### 3.1.9. Software: Kit canino

Un cop es tenen els perfils (en forma d'arxiu que conté els pics, i per l'altra banda en format excel, amb el nom del marcador, altura, al·lel, nom de mostra etc) es procedeix a entrar les dades en el *software Kit Canino*. Aquest *software* és una eina interna que permet comparar un perfil amb els introduïts a la base de dades de mostres de cèl·lules bucals.

En funció del % de coincidència que marca l'analista el software proporciona un menor o major nombre de perfils candidats o coincidents amb la mostra problema.

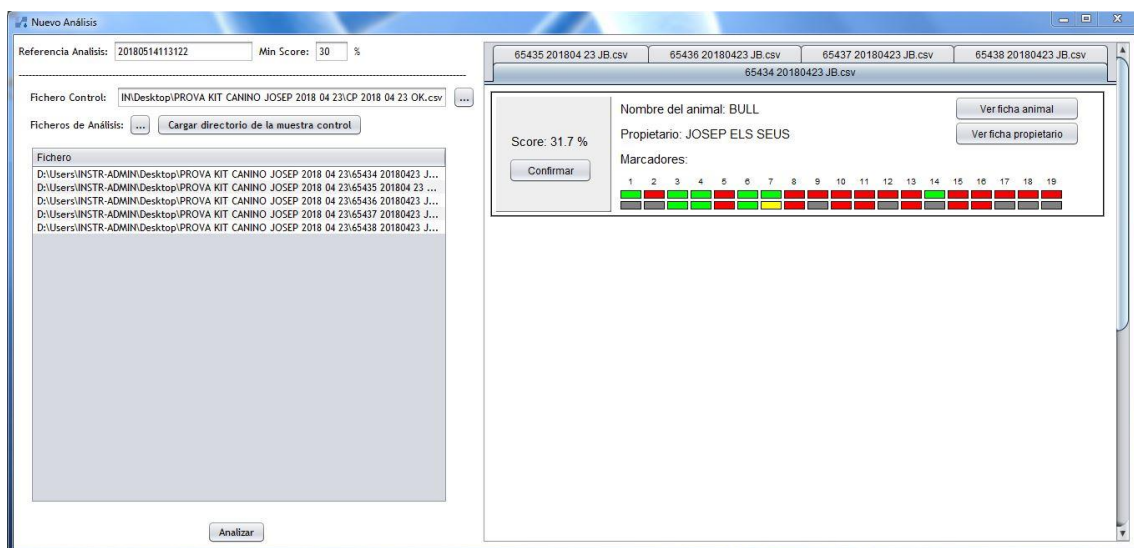
S'ha de fer especial menció al control positiu, ja que en aquesta fase, es necessari associar un control positiu a cada mostra.

El control positiu serà l'element que normalitzarà les diferents mostres seqüenciades en diferents moments, ja que poden produir-se variacions (normalment amb el temps de retenció o la velocitat de migració).



Imatge 4: *software* Kit Canino amb mostres carregades, cap *match* amb 90%

En la imatge anterior, com es pot observar, amb un 90% de semblança no hi ha cap coincidència. En canvi, si es modifica i es redueix, comencen a aparèixer candidats:



Imatge 5: *software* Kit Canino, *match* amb 30% de coincidència

Bé, el *software* detecta la pèrdua de marcador com una no coincidència, de manera que fa disminuir el % de similitud. Aquest és el motiu pel qual s'accepta fins un 65% com a semblança mínima per considerar que la mostra problema pot estar associada a un determinat candidat.

La base de dades poblacional utilitzada en el pas anterior es construeix amb els perfils genètics verificats de mostres de frotis bucal (indubitades). En aquest cas, s'ha estudiat una població de 94 gossos de diferents procedències.

Els possibles perfils coincidents subministrats pel Kit Canino passen a la següent fase.

### 3.1.10. Comparació dels perfils per l'analista

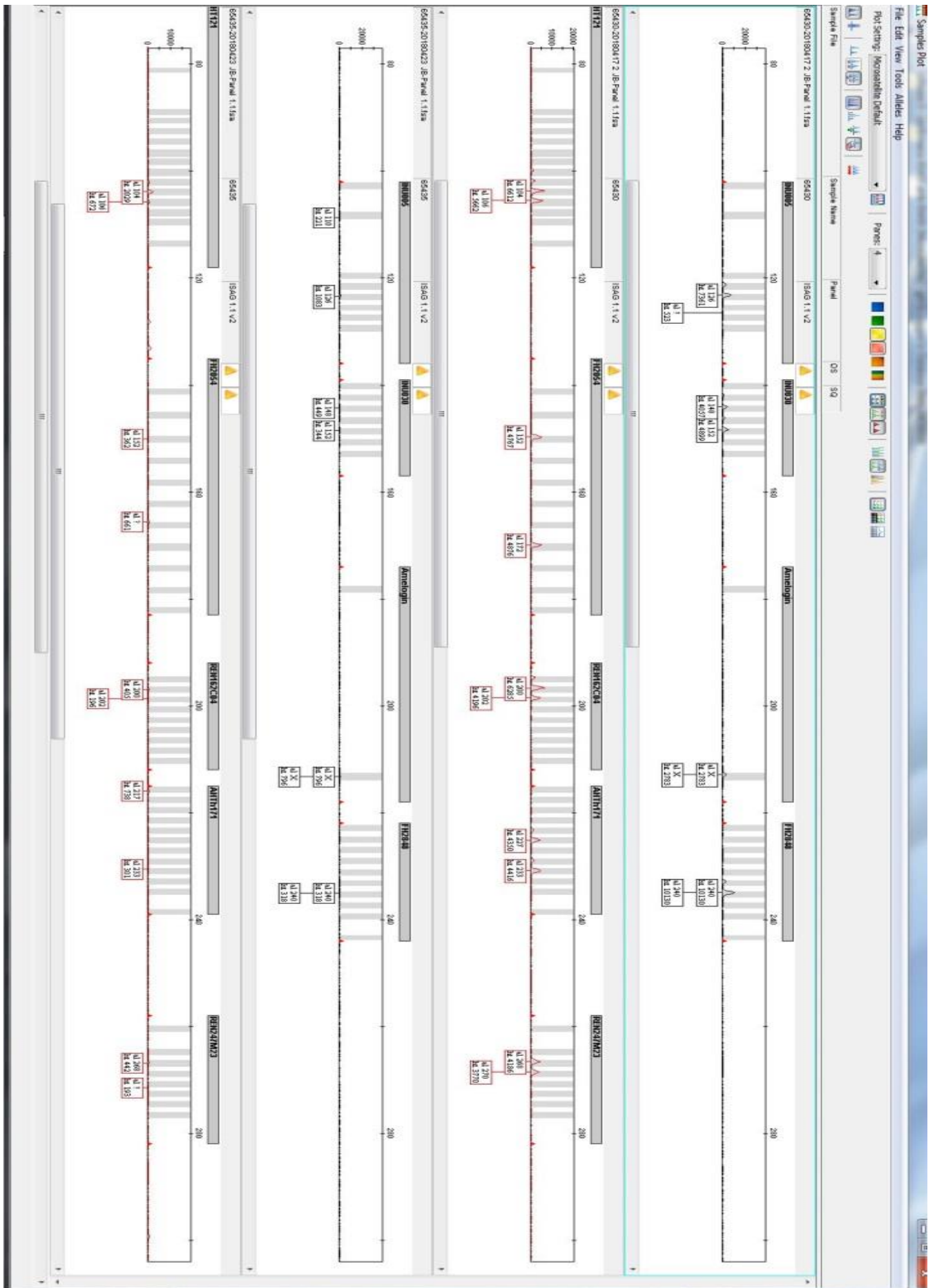
L'analista compara l'electroferograma de la mostra forense (problema) amb cada un dels electroferogrames dels perfils genètics amb coincidència proporcionats pel Kit Canino:

- Si hi ha marcador no coincident entre la mostra forense i la indubtable, es descarta el perfil de referència
- Per poder fer un *match* entre una mostra de femta (forense) i una de cèl·lules bucal (indubitada) tots els marcadors de la mostra de femta trobats han de ser coincidents amb la mostra de cèl·lules bucal.
- Un cop fet el *match* es pot calcular el coeficient de verosimilitud (LR) en funció de les freqüències al·lèliques de la població.

En la taula que apareix a l'apartat d'annexes figura un exemple per determinar si un loci està en equilibri de Hardy-Weinberg.

Finalment, es realitza una comparació manual dels diferents perfils amb possibilitat de candidats recuperats a través del Kit Canino i les mostres forenses de femta, tal i com s'aprecia en les següents imatges:





Imatge 7: Comparació de dues mostres (2)

### **3.2. Detecció i quantificació per qPCR de Legionel·la spp i Legionella pneumophila**

#### **3.2.1. Extracció i purificació**

Les mostres en aquest mètode arriben en el format que el client vulgui. L'únic que és important es que ha de ser un volum mínim de 1000ml.

La llei obliga a realitzar aquest anàlisi per a detectar el gènere legionel·la. A més a més, tot i que no és obligat, algun client també pot estar interessat en saber si aquesta detecció correspon a l'espècie *Legionella pneumophila*.

La primera etapa d'aquesta metodologia consisteix en:

- Una primera fase de concentració, mitjançant filtrat i centrifugat
- Una fase d'extracció. Després d'haver tingut els extractes amb la solució de lisi s'aplica una temperatura de 95°C durant 10 minuts seguidament de 10 minuts a -20°C.
- Finalment la purificació. Amb una centrifugació s'aconsegueix separar l'ADN (sobrenedant) de la resta de productes.

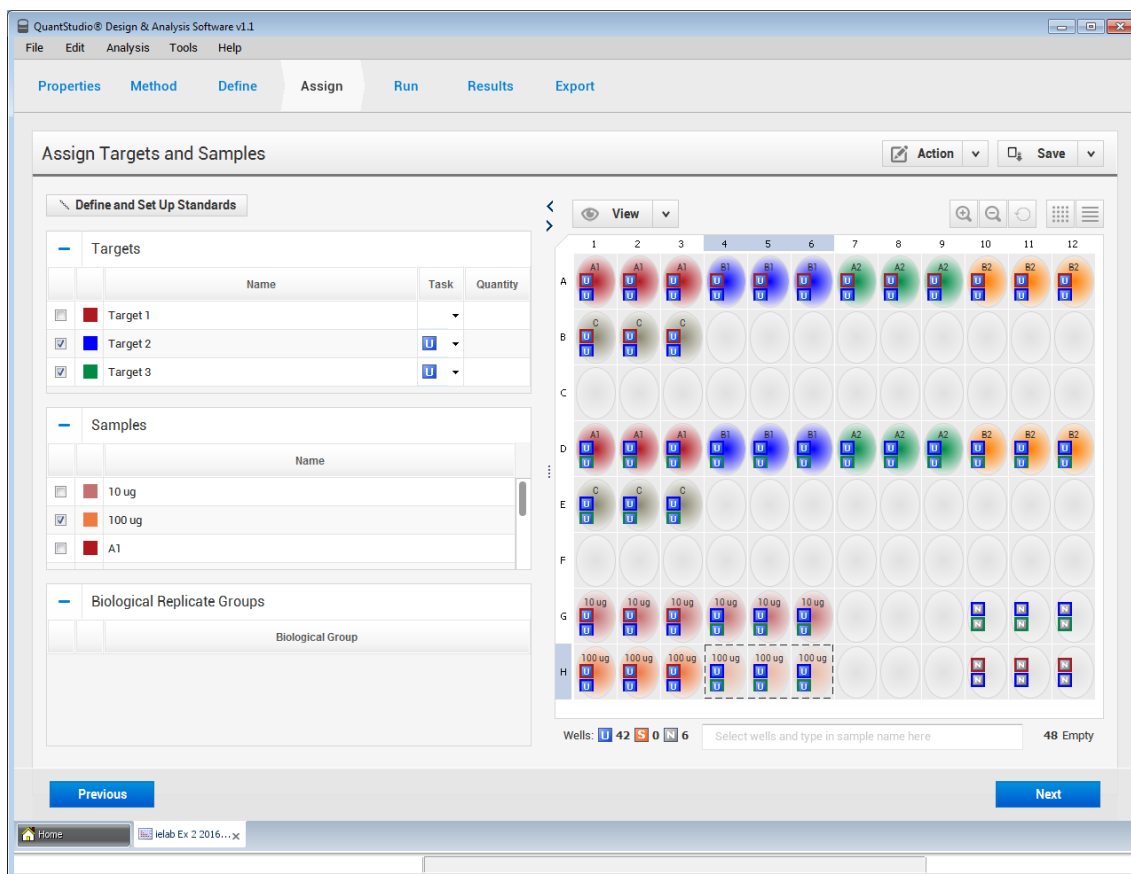
#### **3.2.2. Software: QuantStudio 3**

Un cop es disposa dels extractes amb l'ADN purificat, el següent pas és dissenyar la placa utilitzant el *software*.

En aquest apartat, es carreguen al *software* les etapes de la fase de PCR, juntament amb les mostres i els Targets.

Posteriorment s'assignen les mostres en els pous pertinents, així com les rectes de calibratge, els blancs, patrons etc...

Finalment es defineixen 3 Targets diferents, cadascú amb una combinació de Reporter-Quencher, que permeten distingir si hi ha una amplificació deguda al gènere legionel·la o si bé si ha una amplificació específica de l'espècie *L. pneumophila*.



Imatge 1: Software amb mostres i *Targets* assignats

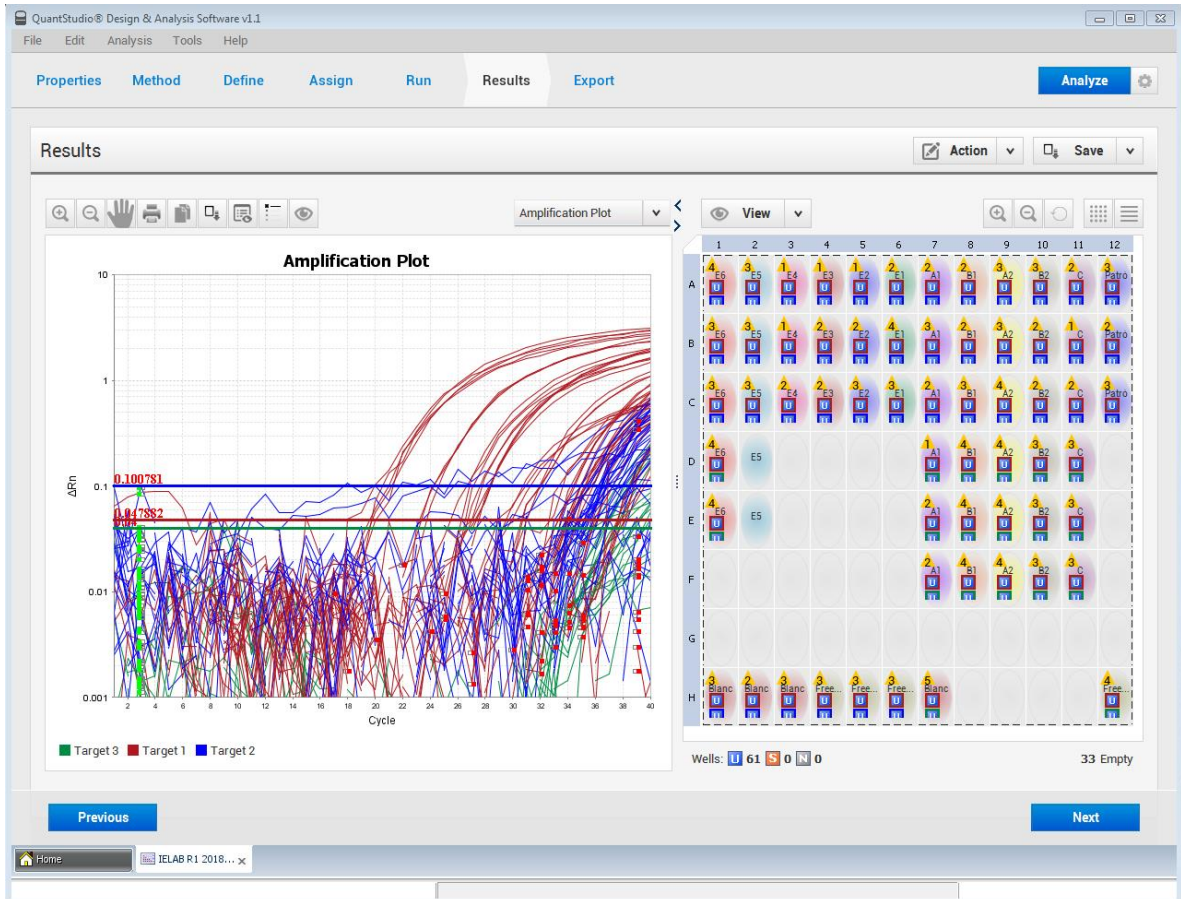
Dins de la mateixa placa es fan 2 anàlisis, ja que per una banda es detectarà la presència d'ADN del gènere *legionel·la*, i per l'altra banda es quantificarà l'ADN de l'espècie *Legionella pneumophila*.

A més a més, al tractar-se d'un assaig biològic, els valors de quantificació tenen més variabilitat. Per tal de reduir aquesta variabilitat, cada mostra s'estudia per triplicat, ja que d'aquesta manera permet donar uns resultats més acurats.

### 3.2.3. Preparació de la placa per a la PCR

Per a la preparació de la placa, només cal seguir l'esquema de distribució assignat en el pas anterior, tenint en compte en quines mostres es fiquen els reactius per a amplificar i detectar el gènere *legionel·la*, i en quins pous s'han de ficar els reactius que donaran senyal si hi ha amplificació per l'espècie *L. pneumophila*.

Durant aquest procés es portarà a terme l'amplificació del gen MIP que codifica la proteïna potenciadora d'infectivitat a macròfags característica de la legionel·la.



Imatge 2: Resultats de la quantificació per qPCR

Arribats a aquest punt, l'últim pas és aplicar els càlculs corresponents tenint en compte el nombre d'unitats genòmiques detectades al pou d'amplificació, el factor de dilució, el factor de conversió i el volum de la mostra inicial filtrada.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts per una part en l'estudi dels STRs canins i per l'altra la detecció i quantificació per qPCR de la legionel·la spp.

Cal apuntar també, que al tractar-se de resultats d'ADN no humà, la contaminació per part de l'operari a les mostres pràcticament és inexistent, cosa que no passa amb mostres d'ADN humà on s'han d'extremar les precaucions per a evitar possibles contaminacions.

### 4.1. STRs canins

Arriba una mostra d'un frotis bucal al laboratori, juntament amb una femta. Es sol·licita si la femta pot haver estat dipositada pel gos vinculat al frotis bucal.

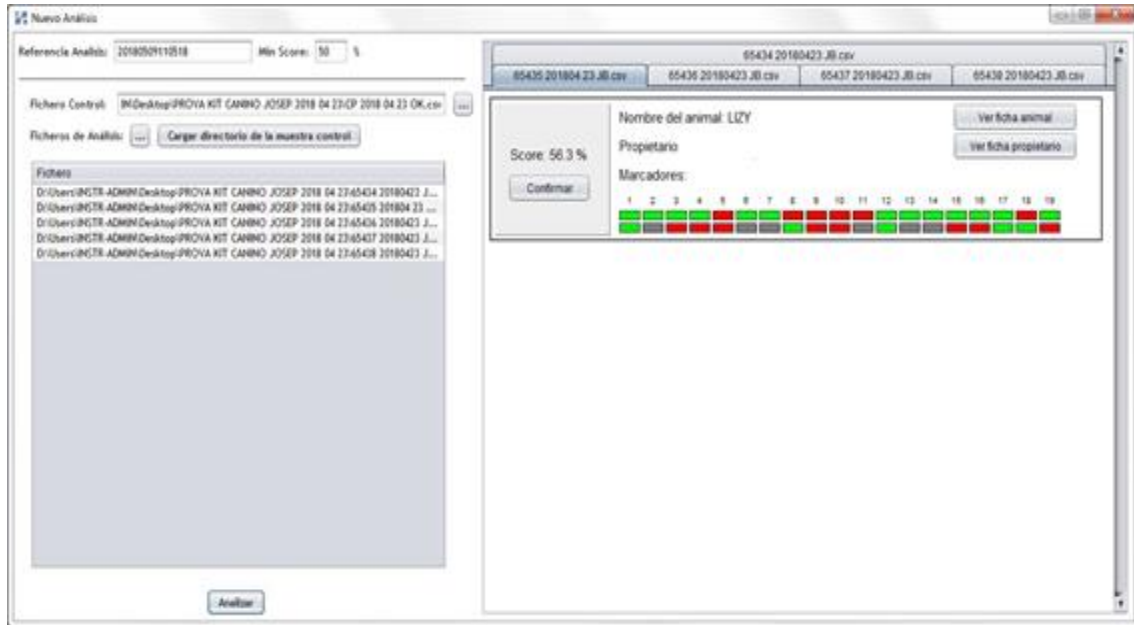
Després d'aplicar la metodologia concreta, s'arriba a obtenir dos perfils, un de la mostra bucal i l'altra de la femta.

Un cop estan els perfils nets i correctament assignats els pics, un arxiu CSV recull els marcadors i els al·lels d'ambdues mostres.

	A	B	C	D	E	F
1	Dye/Sample	Sample File	Marker	Allele	Size	Height
2	B,69	65435-20180	AHTk211	89	84.55	1198
3	B,70	65435-20180	AHTk211	91	86.51	1394
4	B,73	65435-20180	CXX279	116	111.49	934
5	B,76	65435-20180	REN169O18	164	158.55	702
6	B,78	65435-20180	INU055	210	195.86	123
7	B,79	65435-20180	INU055	222	207.8	365
8	G,44	65435-20180	INRA21	95	87.71	3540
9	G,50	65435-20180	AHT137	131	127.24	1712
10	G,54	65435-20180	REN169D01	214	208	120
11	G,55	65435-20180	REN169D01	220	214.19	192
12	Y,56	65435-20180	INU030	148	144.24	449
13	Y,58	65435-20180	INU030	152	148.46	344
14	Y,60	65435-20180	Amelogenin	X	213.2	796
15	Y,62	65435-20180	FH2848	240	235.02	318
16	R,48	65435-20180	AHT121	104	103.84	2029
17	R,59	65435-20180	FH2054	152	150	362
18	R,63	65435-20180	FH2054	168	165.57	661
19	R,66	65435-20180	REN162C04	200	196.92	405
20	R,67	65435-20180	REN162C04	202	198.65	196
21	R,70	65435-20180	AHTh171	217	215.96	738
22	R,73	65435-20180	AHTh171	233	230.6	301
23	R,74	65435-20180	REN247M23	268	266.8	442
24	R,75	65435-20180	REN247M23	272	271.4	193

Imatge 3: Exemple arxiu CSV d'una mostra de femta

Aquests dos arxius es carreguen al *software* Kit Canino, juntament amb el control positiu associat a cada *run* i dona el següent *match* amb un grau de coincidència:



Imatge 4: *Match* del 50% entre la mostra entrada i els registres de la base de dades

Un pas més enllà és calcular l'LR de la mostra tenint en compte la població total, ja que cal recordar que aquest % de coincidència surt de comparar la mostra femta vs frotis bucal, i que la pèrdua al·lèlica penalitza a aquest valor.

Des del laboratori, no es té com a norma la de calcular sempre aquest LR, ja que no es tracta de mostres relacionades amb casos penals, i que tampoc estan relacionades en humans. Tot i així, disposen d'un full de càlcul que permet obtenir aquest valor.

Abans de realitzar el càlcul, per comparació s'observa que hi ha microsatèl·lits que en la mostra bucal s'observen com heterozigots i en canvi en la mostra de femta són homozigots, això pot ser degut a la mala amplificació de determinats al·lèls. Per tant, ja que el *software* ens dona un 50% de coincidència, es realitza l'LR sobre aquest 50% d'al·lèls coincidents ,excloent els altres, suposant que hi ha hagut pèrdua al·lèlica.

Mostra bucal		Mostra femta		Càlcul freqüències	
Marker	Allele	Marker	Allele	Freq.	
AHTk211	89	AHTk211	89	0,239	0,137186
AHTk211	91	AHTk211	91	0,287	
CXX279	116	CXX279	116	0,133	0,017689
INRA21	95	INRA21	95	0,372	0,138384
AHT137	131	AHT137	131	0,181	0,032761
INU030	148	INU030	148	0,101	0,020402
INU030	152	INU030	152	0,101	
Amelogin	X	Amelogin	X		
FH2848	240	FH2848	240	0,33	0,1089
REN162C04	200	REN162C04	200	0,048	0,035712
REN162C04	202	REN162C04	202	0,372	
				Probabilitat=	8,72913E-10
				LR	1.145.589.698

Imatge 5: Taula del càlcul per determinar LR

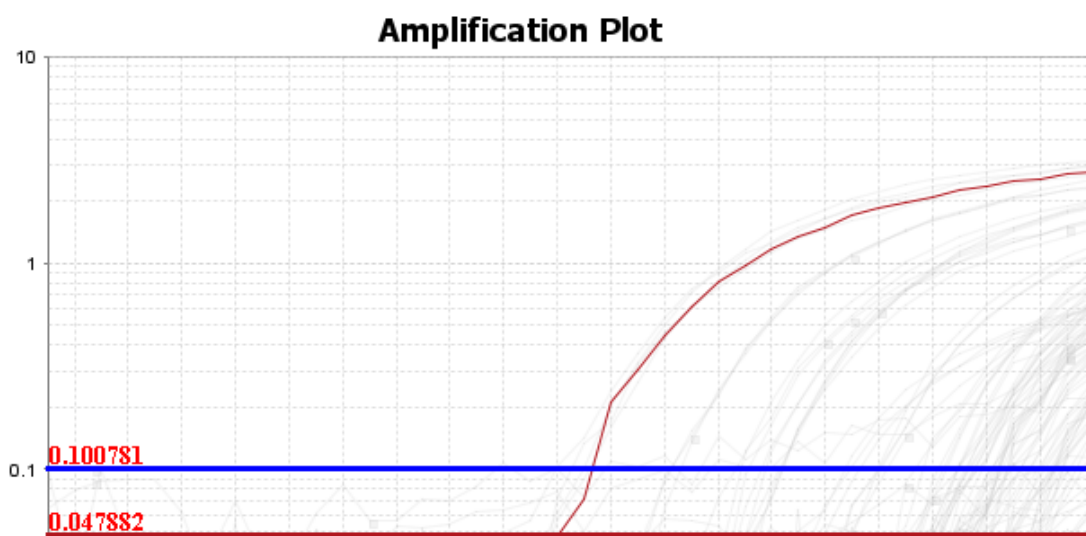
L'LR resultant és de 1.145.589.698.

#### **4.2. Detecció i quantificació per qPCR de legionel·la spp i Legionella pneumophila**

Pel que fa al apartat de resultats, en relació a la determinació per qPCR, s'observa com a partir d'un cicle en concret (depenent de la concentració d'unitats genòmiques inicials) totes les mostres en la mateixa concentració comencen a donar resposta. Comparant-ho amb les rectes patró, els blancs i altres elements de control, es pot assegurar que l'assaig ha sigut exitós.

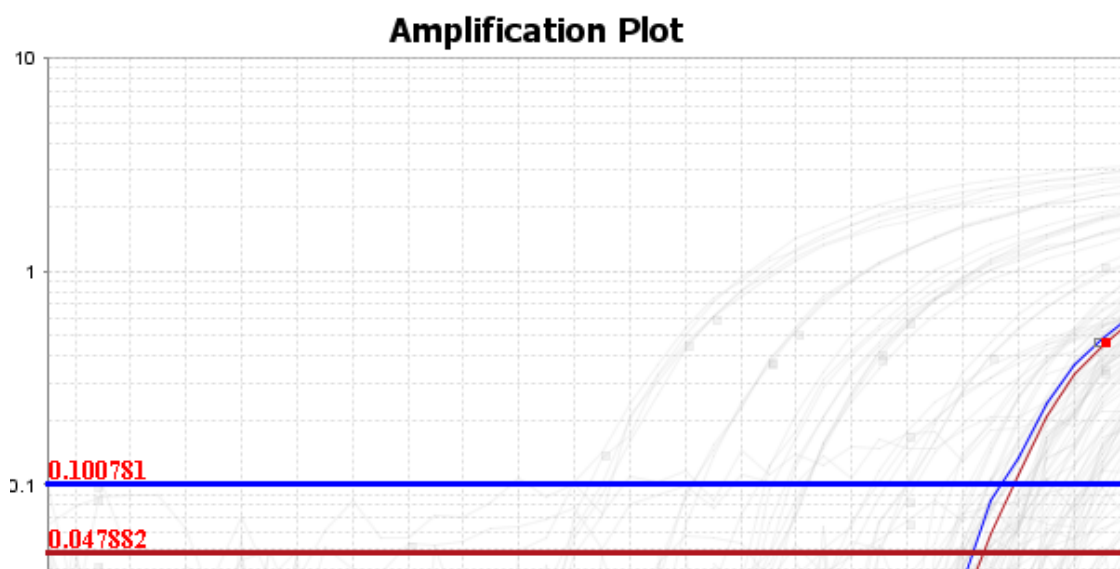
Si s'analitzen les caselles individualment, poden aparèixer un dels següents escenaris:

Detecció del Target 1: aquest marcador actua com a control positiu del procés d'amplificació. Tanmateix, indica que no hi ha presència de l'ADN estudiat.



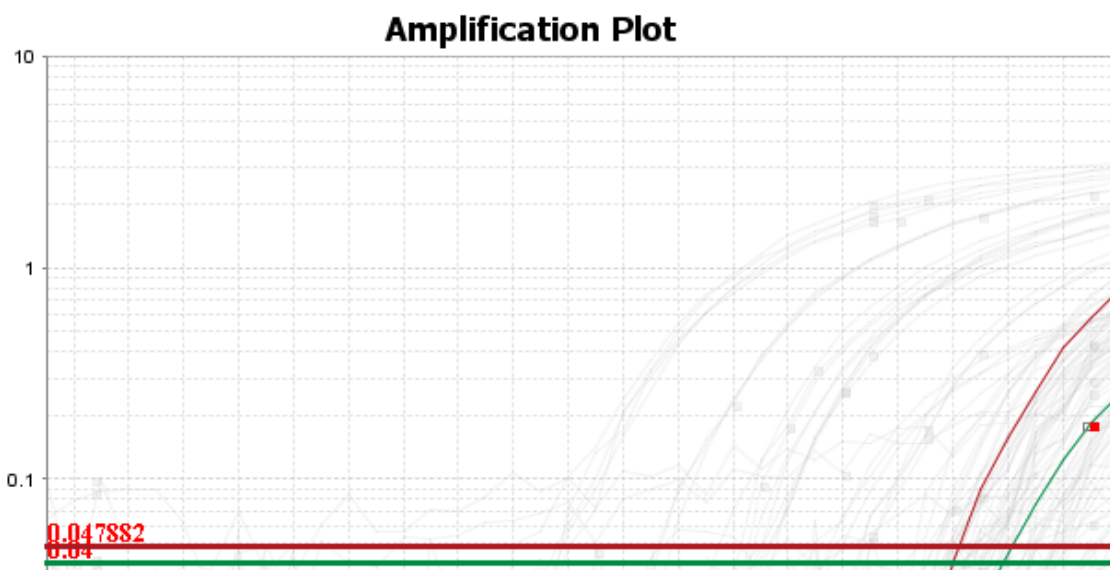
Imatge 6: Indicador de control

Detecció del Target 1+2: la combinació d'aquest dos marcadors connoten l'èxit del procés de qPCR i també l'amplificació d'ADN de la família de la legionel·la.



Imatge 7: Indicador control + target 2

Detecció del Target 1+3: en aquest context es pot apreciar que el procés d'amplificació ha sigut exitós, juntament amb una replicació de l'ADN específic de l'espècie *Legionella pneumophila*.



Imatge 8: Indicador control + target 3

### 4.3. Propostes de futur

Recuperant el punt referent als STRs canins, aquestes proves també podrien anar dirigides a determinar els parentescs de diferents individus, així com en la determinació de la raça del gos.

També es podria obrir una via d'estudi del ADNm, tancant així el cercle de l'estudi de parentescos.

Pel que fa a l'estudi dels STR amb finalitat d'identificació de femtes, encara queda un llarg recorregut per a que aquesta pràctica consolidi en els ajuntaments, ja que requereix per una banda, tenir tots els gossos de cada població censats, amb una col·laboració dels centres veterinaris per a extreure mostres de frotis bucal per a elaborar les bases de dades.

Alguns dels municipis on es realitzen aquests controls de femta a través de l'ADN són Xàtiva (STR's), Paterna, Parets del Vallés (SNPs), Mollet (SNPs), Súria i Callús,

A més a més, afegixo els aspectes mencionats per la Universitat de Vermont (2007) millorables en aquest àmbit, com ara la falta de bases de dades de referència, i experts que puguin testificar en un judici oral, i les qüestions que planteja Sensabaugh i Kaye (1998) sobre com han de ser aquestes dades de

bases (obtenció), l'interval de l'error de mesura en aquestes mostres provinents de fonts no humanes, l'estimació de la probabilitat de coincidència aleatòria o la freqüència del genotip.

## 5. CONCLUSIONS

Pel que fa a les conclusions que es poden extreure d'aquest treball, es poden agrupar en 3 punts:

Com a primera, i referent a l'apartat d'STRs canins, s'observa habitualment que els marcadors genètics en mostres de frotis bucal presenten menys degradació que en mostres de femta. L'anàlisi comparatiu dels perfils genètics de mostres a partir de frotis bucal i de femtes presenta una dificultat, i es que no s'amplifiquin tots els marcadors genètics en les mostres de femta. Aquest fenomen es pot explicar per la degradació que sofreix l'ADN (concretament els marcadors més grans).

Com a segona conclusió, els gossos estudiats en l'estada a l'empresa presenten més heterozigosi que els de raça pura de la base de dades en els marcadors amplificats. Dels anàlisis realitzats al laboratori durant l'estada s'observa que l'homozigosi guarda relació amb la puresa de les races, observant més presència d'heterozigosi en mostres de gossos mestissos.

Finalment, com a tercera conclusió, s'ha validat l'eficàcia de la tècnica per a la detecció i quantificació de legionel·la mitjançant qPCR. És una metodologia que optimitza la variable "temps d'anàlisi" si es compara amb la tècnica per medis de cultiu.

La legionel·la en medi de cultiu necessita un mínim de 10 dies (aprox) per créixer i formar colònies visibles que es puguin comptar, de manera que aquesta tècnica de qPCR permet realitzar un *screening* ràpidament. Tot i així, per a tenir validesa legal, els resultats han d'estar obtinguts mitjançant el procediment per medis de cultiu, ja que els resultats d'aquests cultius proporcionaran informació sobre bacteries vives, i amb la qPCR no es discrimina entre ADN de microorganismes vius o morts.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Barnard Health Care (2015). Nonhuman DNA Testing And Microbial Forensics [HTML]. *Forensic Science*. Recuperat de: <https://www.barnardhealth.us/forensic-science/nonhuman-dna-testing-and-microbial-forensics.html>
- Bej A K, Mahbubani M H i Atlas R M (1991). Detection of Viable *Legionella pneumophila* in Water by Ploymerase Chain Reaction and Gene Probe Methods. *Applied and Environmental Microgiology*. vol 57 n<sup>o</sup> 2 p 597-600.
- Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M i Randi E (2010). Forensic DNA against wildlife poaching: Identificacion of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics* 4 (2010)334-338
- Denise S, Johston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfed D, McKenna S, Sharp T i Edwards J, (2003). Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel club breedds using 17 canine microsatellite markers. International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 35, 14-17.
- Dunbar M T. (2005). DNA Analysis of Natural Fiber Rope. University of California, Davis. *Journal of Forensic Science*.
- Halverson, JL i Basten, C (2005). Forensic DNA Identification of Animal-derived Trace Evidence: Tools for Linking Victims and Suspects. *Forensic Science Croat Med J* 2005:46(4):598-605
- Herpers, B. L., de Jongh, B. M., van der Zwaluw, K., & van Hannen, E. J. (2003). Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology*, 41(10), 4815-4816.
- Iyengar A i Hadi S (2013). Use of non-human DNA analysis in forensic sciencie: A mini review. *Medicine, Science and the Law*. 54:41
- Jennings Simões, E. L. (2017). Forensic Use of the Piracatinga Fish (*Callophysius macropterus*) to Locate and Identify Human Remains Retrieved From the Amazon River. *Journal of forensic sciences*.

- Kanthaswamy, S (2009). Development and Validation of a Standardized Canine STR Panel for Use in Forensic Casework. *U.S. Department of Justice*.
- Menotti-Raymond M, David VA, Stephens JC, Lyons LA, O'Brien SJ. Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications. *J Forensic Sci* 1997, 42(6):1039-1051.
- Metzker M, Mindell D, Xiao-Mei Liu, Ptak RG, Gibbs R i Hillis D (2002). Molecular evience of HIV-1 transmission in a criminal case. *PNAS* 99 .22
- Meyers-Wallen, V. N. (2001). Relevance of the canine genome project to veterinary medical practice. *Recent advances in Small Animal Reproduction. Ithaca (NY): International Veterinary Information Service A, 1218, 0601.*
- Neff, MW, Broman KW, Mellers CS, Ray K, Acland GM, Aguirre GD, Ziegle J, Ostrander EA I Rine J (1998). A Second-Generation Genetic Linkage Mal of the Domestic Doc, *Canis familiaris*. *Genetics Society of America*.
- Reischl, U., Linde, H. J., Lehn, N., Landt, O., Barratt, K., & Wellinghausen, N. (2002). Direct detection and differentiation of Legionella spp. and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of clinical microbiology, 40(10), 3814-3817.*
- Schmitz H, Bleckmann H i Mürtz M (1997). Pet cat hair implicates murder suspect. *Scientific correspondence. Nature, 386.*
- Sensabaugh G i Kaye D H (1998). Non-Human DNA Evidence. 38 *Jurimetrics J. 1-16 (1998).*
- Universitat de Vermont (2007). Non-human DNA Testing[PDF]. Recuperat de [http://www.uvm.edu/~biology/Classes/296D/11\\_Non-human.pdf](http://www.uvm.edu/~biology/Classes/296D/11_Non-human.pdf)
- Wetton J, Higgs J, Spriggs, A, Roney CA, Tsang C i Foster A (2003). Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Science International* 133 (2003) 235-241.
- Wilson, D. A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S. M., & Procop, G. W. (2003). Detection of Legionella pneumophila by real-time PCR for the mip gene. *Journal of clinical microbiology, 41(7), 3327-3330.*

## 7. ANNEX

AHTK211	Genotips	Freqüència	Genotips	Freq. Genot.	Calc. Genoti	Obs vs Exp	d <sup>2</sup>	d <sup>2</sup> /e
87/87	7		87/87	0,05477592	5,14893617	1,85106383	3,4264373	0,6654651
87/89	6		87/89	0,11204165	10,5319149	-4,53191489	20,5382526	1,95009671
87/91	11	87=	87/91	0,13444998	12,6382979	-1,63829787	2,68401992	0,21237195
87/93	1		87/93	0,01493889	1,40425532	-0,40425532	0,16342236	0,11637653
87/95	10		87/95	0,08216388	7,72340426	2,27659574	5,18288818	0,67106266
87/97	2		87/97	0,01493889	1,40425532	0,59574468	0,35491172	0,25274017
89/89	9		89/89	0,05729402	5,3856383	3,6143617	13,0636105	2,4256383
89/91	14		89/91	0,13750566	12,9255319	1,07446809	1,15448167	0,08931792
89/93	1	89=	89/93	0,01527841	1,43617021	-0,43617021	0,19024445	0,13246651
89/95	4		89/95	0,08403124	7,89893617	-3,89893617	15,2017033	1,9245254
89/97	2		89/97	0,01527841	1,43617021	0,56382979	0,31790403	0,2213554
91/91	10		91/91	0,0825034	7,75531915	2,24468085	5,03859212	0,64969501
91/93	2		91/93	0,01833409	1,72340426	0,27659574	0,07650521	0,04439191
91/95	7	91=	91/95	0,10083748	9,4787234	-2,4787234	6,14406971	0,64819591
91/97	0		91/97	0,01833409	1,72340426	-1,72340426	2,97012223	1,72340426
93/93	0		93/93	0,00101856	0,09574468	-0,09574468	0,00916704	0,09574468
93/95	1	93=	93/95	0,01120416	1,05319149	-0,05319149	0,00282933	0,00268644
93/97	1		93/97	0,00203712	0,19148936	0,80851064	0,65368945	3,41371158
95/95	5	95=	95/95	0,03081145	2,8962766	2,1037234	4,42565216	1,52804886
95/97	1		95/97	0,01120416	1,05319149	-0,05319149	0,00282933	0,00268644
97/97	0	97=	97/97	0,00101856	0,09574468	-0,09574468	0,00916704	0,09574468
Individus:	94	TOTAL=	TOTAL=	1	94			
Al·lels totals:	188	df=21-1=	X <sup>2</sup> =	16,8657	<	31,4104	EN EQUILIBRI	

Annex 1: Comprovació equilibri Hardy-Weinberg per a un marcador en concret. Font de les freqüències al·lèliques: Laboratori d'EMATSA