



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL
ANÁLISIS DE ADN EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A
RUBI RUBIO RIVERA**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA LOURDES VEGA NAVARRETE**

**ASESORA DE TESIS
MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES**



CD. MX. , 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a la Doctora María Lourdes Vega Navarrete, por darme esta gran oportunidad y por la confianza brindada. Gracias por su interés en mi crecimiento profesional, por permitirme ver más allá de lo académico abriéndome el panorama profesional, por compartir su conocimiento y experiencia, gracias a usted desarrollé mi gusto por la Genética Forense.

A la Maestra Leonor Aguilar Santelises, por asesorar este proyecto y por su inagotable paciencia, así como su entusiasmo, gracias por ser parte de este proceso tan importante para mí y por sus comentarios para lograr un mejor trabajo.

Al Licenciado Jorge Antonio Zogbi Velázquez por permitirme estar en su laboratorio y brindarme los recursos necesarios para poder realizar este gran proyecto.

A mis maestros, las Biólogas Dora Villegas Carmona y Marisol Ortega Rosales y a los QFBs Erika Ramírez Flores y Ricardo Ríos Rivas, por compartir su conocimiento en el área, por todo su apoyo durante el desarrollo de este proyecto, por su profundo espíritu de equipo y enseñanza y por su grata compañía durante todo este proceso.

A la Bióloga Emilia Colio Robledo y a la QFB Jennifer Celeste Piñón Rosales, por ser un gran equipo y compartir tantas experiencias juntas.

A mis profesores de la Facultad, por ser parte importante en mi desarrollo profesional, agradezco a cada uno de ustedes sus enseñanzas.

A todas las personas que colaboraron en la donación de las muestras necesarias para poder realizar este proyecto, incluyendo al personal de la Distribuidora Comercial Zogbi.

Y finalmente a mis sinodales, por el tiempo dedicado a la lectura y revisión del presente trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis padres, Josefina Rivera Pérez y Francisco Rubio Rangel, por todo su amor y apoyo, por confiar en mi capacidad y ser un ejemplo de vida. Gracias a mi madre por acompañarme en todo momento a lo largo de este largo camino, por esas noches de desvelo que eran más amenas con su presencia; gracias a mi padre por cada consejo, quien me enseñó grandes valores y anhelar siempre lo mejor para mí.

A mis hermanos, Jovanni, Fredi y Uriel, por ser los mejores compañeros de tantas aventuras, ser motivo de muchas de mis alegrías, su cariño, confianza y apoyo, que a pesar de nuestras diferencias y el bullying, siempre seremos grandes hermanos.

A mi novio Cristian Alonso Martínez Martínez, por todo su amor y apoyo durante todos estos cuatro años y contando, por ser el hombre que me cambió la vida, con quien comparto metas y sueños. Porque hemos compartido grandes experiencias que nos han hecho crecer y mejorar cada día. Gracias por estar conmigo en todo momento y ser una inspiración. Te amo mi vida.

A mi cuñada Brenda Flores, por ser más que eso, una amiga. Gracias por compartir tantos momentos, por esas largas pláticas de media noche.

A mi amiga Flor Andrea González Oropeza, por estar juntas desde el inicio de la carrera. Gracias por tantas alegrías durante tantos años. Cada momento compartido ha sido increíble, por estar juntas en todo momento compartiendo risas y llanto, por ser mi ejemplo de un alma libre, por ser la mejor amiga, compañera y colega, porque siempre fuimos el equipo perfecto.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, Susan Angélica Mundo Galicia, Giselle Gaspar Martínez, Luis Ángel Espinoza Hernández, Víctor Jiménez, Alexis Guzmán Badillo, José Francisco López, Miguel Erikzel Aquino Pérez, Teresita de Jesús Nolasco Pérez, Jennifer Celeste Piñón Rosales, Daniela Nuñez, Julieta Corona, Simón Ávalos, por hacer de la vida un montón de risas.

"Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los
hombros de gigantes"

-Issac Newton

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
1) Componentes y estructura del ADN	5
2) Estructura del genoma humano	7
2.1) ADN codificante	8
2.2) ADN no codificante	8
2.2.1) Repeticiones en tándem	8
2.2.1.1) Minisatélites	8
2.2.1.2) Microsatélite	9
3) Polimorfismo	10
4) Técnicas de análisis de polimorfismo	11
4.1) Pruebas de orientación	11
4.1.1) ABACard® HemaTrace	12
4.1.2) ABACard® p30	14
4.1.3) SALIgAE®	15
4.2) Extracción y purificación	17
4.2.1) Tissue and Hair Extraction Kit	18
4.2.2) Extracción de ADN de hueso con Bone Incubation® Buffer	18
4.2.3) DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 Forensic Instrument	20
4.2.4) Papel FTA	22
4.3) PCR en tiempo real o cuantitativa	23
4.3.1) Plexor® HY System	24
4.3.2) Biomek® 3000	25
4.3.3) Stratagene MX3005P®	26
4.4) PCR punto final	27
4.4.1) PowerPlex® Fusion System	29
4.4.2) PowerPlex® Y23 System	30
4.5) Electroforesis Capilar	31

4.6) Análisis de fragmentos	33
5) Aplicaciones en investigación de la paternidad, criminalística e identificación de personas desaparecidas.	34
6) Validación interna para laboratorios forenses	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
OBJETIVOS GENERALES	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
HIPÓTESIS	40
METODOLOGÍA	41
TIPO DE ESTUDIO	41
UNIVERSO DE ESTUDIO	41
CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN	41
VARIABLES	42
MATERIAL Y MÉTODO	43
TÉCNICAS	46
RESULTADOS	59
ANÁLISIS DE RESULTADOS	89
CONCLUSIONES	101
ANEXO A	103
ANEXO B	104
REFERENCIAS	105
GLOSARIO	110

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
ADNn	Ácido Desoxirribonucleico Nuclear
C	Citosina
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CODIS	Sistemas de Índice Combinado de ADN
dNTP	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EC	Electroforesis Capilar
EC	Conformidad Europea
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ema	Entidad Mexicana de Acreditación
ESS	European Standard Set
FTA	Flinders Technology Associates
G	Guanina
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IEC	Comisión Electrotécnica Internacional
IMNC	Instituto Mexicano de Normalización y Certificación
IPC	Control Positivo Interno
ISO	Organización Internacional de Normalización
LEV	Volumen De Baja Elución
NMX	Norma Mexicana
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMT	Tubo Fotomultiplicador
QPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RFU	Unidad Relativa de Fluorescencia
STR	Repeticiones Cortas en Tándem
STR-Y	Repeticiones Cortas en Tándem de Cromosoma Y
SWGAM	Grupo de Trabajo Científico del FBI en Métodos de Análisis de ADN
T	Timina
TWGAM	Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos de Análisis de ADN
UV	Ultravioleta
VNTR	Repeticiones En Tándem De Número Variable

INTRODUCCIÓN

La Genética Forense es una subespecialidad de la Genética y de la Medicina Legal que incluye un conjunto de conocimientos de genética necesarios para resolver ciertos problemas judiciales. En la actualidad, la tecnología del ADN se ha convertido en una herramienta indispensable, que se solicita de forma rutinaria y que es admitida por la mayoría de los Tribunales de Justicia, tanto en la investigación genética de vestigios biológicos de interés criminal en el ámbito penal, como en la investigación biológica de la paternidad en el ámbito civil.⁽¹⁻³⁾

Antes de la aplicación del ADN los marcadores genéticos que se utilizaban para estas finalidades (HLA, proteínas, enzimas, grupos sanguíneos) presentaban grandes limitaciones cuando se trataba de analizar muestras degradadas o en minúscula cantidad lo que sucede con mucha frecuencia en el trabajo forense. Esto era particularmente cierto para el análisis de manchas de semen, pelos o cabellos donde era excepcional proporcionar algún dato acerca de la correspondencia de un vestigio a un probable agresor con lo que la ayuda a la justicia era muy limitada.⁽⁴⁾

El descubrimiento de las regiones hipervariables de ADN por Jeffreys y colaboradores (1985) y la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han supuesto una de las mayores innovaciones en las Ciencias Forenses, especialmente en aspectos relacionados con la identificación de personas, análisis de vestigios biológicos e investigación biológica de la paternidad. Los polimorfismos de ADN hipervariables poseen tal capacidad identificadora que son considerados, hoy en día, un instrumento de elección en la resolución pericial de casos en Genética Forense.⁽⁵⁾

Al principio de la aplicación de estas técnicas de identificación genética se planteó un serio debate entre la comunidad científica y la jurídica sobre la fiabilidad y repetitividad del método. Por lo que se puso de manifiesto la necesidad de normalizar los métodos de análisis, de llevar a cabo los pertinentes estudios de validación y que llevaron al establecimiento de una serie de criterios rigurosos sobre aspectos científicos, metodológicos y de evaluación estadística de la prueba del ADN que finalmente desembocaron en el desarrollo de un estricto sistema de control de calidad para garantizar la fiabilidad de la prueba. La forma de evaluar si realmente los laboratorios cumplen las medidas de calidad exigidas es a través de programas de

acreditación en los que se realiza una evaluación periódica de los distintos aspectos que pueden influir en la prueba del ADN.⁽¹⁾

Aunado a esto, en Junio de 2008, el Gobierno Federal anunció en el Diario Oficial de la Federación la Reforma Procesal Penal. Con esta reforma, México cambió su actual Sistema de Justicia de inquisitivo a uno completamente acusatorio, lo que conlleva a la implementación de juicios orales y procesos simplificados, por lo que la EMA en coordinación con laboratorios forenses de distintas dependencias gubernamentales y laboratorios particulares, estarán trabajando para asegurar la calidad de los resultados de los análisis de indicios o evidencia, bajo la norma ISO/IEC 17025:2017, como una base de una mejora del Sistema de Impartición de Justicia, ya que se garantiza la calidad de los resultados reportados en un dictamen pericial.⁽⁶⁾

La norma ISO/IEC 17025:2017 establece los requisitos que permiten a los laboratorios demostrar que operan de forma competente y que tienen la capacidad de generar resultados válidos. Este documento sugiere que el laboratorio planifique e implemente acciones para abordar los riesgos y las oportunidades. Al abordar los riesgos y las oportunidades se establece una base para incrementar la eficacia del sistema de gestión, lograr mejores resultados y prevenir efectos negativos. El laboratorio es responsable de decidir qué riesgos y oportunidades es necesario abordar. El uso de este documento facilitará la cooperación entre los laboratorios y otros organismos, y ayudará al intercambio de información y experiencia, así como también a la armonización de normas y procedimientos. La aceptación de resultados entre países se facilita si los laboratorios cumplen con el presente documento.⁽⁷⁾

La Norma indica que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previstos o modificados de otra forma, estos deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación. La validación interna que se realiza en cada laboratorio de Genética Forense, deberá incluir, según corresponda: muestras de evidencia conocidas y no probatorias o muestras de evidencia simulada, reproducibilidad y precisión, estudios estocástico, de sensibilidad, evaluación de contaminación y mezclas.⁽⁸⁾

MARCO TEÓRICO

La unidad básica de la vida es la célula, una especie de fábrica en miniatura que produce materias primas, energía y es capaz de eliminar residuos necesarios para mantener la vida. Un ser humano se compone de aproximadamente 100 billones de células, las cuales se originaron a partir de una sola célula. Dentro del núcleo de estas existe una sustancia conocida como ADN que contiene la información para su replicación y la construcción de enzimas necesarias. Debido a que este ADN reside en el núcleo de la célula, se refiere a menudo como ADN nuclear (ADNn), Figura 1. Las mitocondrias, organelos subcelulares que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función principal es la producción de la energía celular, también tienen ADN, llamado ADN mitocondrial (ADNmt).

El conjunto completo de instrucciones para construir un organismo, es decir, todo el ADN en una célula, se conoce colectivamente como genoma: genoma nuclear y genoma mitocondrial. El ADN tiene dos propósitos principales: 1) hacer copias de sí mismo para que las células puedan dividirse y seguir con la misma información, y 2) contener las instrucciones para formar proteínas, que dirigen casi todos los procesos vitales. La información codificada en la estructura del ADN nuclear se transmite de generación en generación y contiene la mitad de información que proviene de la madre y la mitad del padre.⁽⁹⁾

Hay una parte del genoma nuclear que es específico del varón, se trata del cromosoma Y, que se transmite exclusivamente por vía paterna a la descendencia de varones de manera más o menos inalterada a lo largo de las generaciones. En este cromosoma existen también regiones cortas de ADN repetitivo variable en tamaño, cuyo estudio permite en este caso trazar linajes paternos incluso de varias generaciones. Además el cromosoma Y es una herramienta que permite obtener un patrón genético específico del varón, lo cual tiene un gran interés práctico en la identificación genética de restos de semen y otros fluidos biológicos del supuesto agresor en los casos de agresiones sexuales.⁽¹⁰⁾ En contraste, el ADNmt también se hereda de generación en generación pero en forma matrilineal, por lo que cada individuo portará la información genética de su madre en cada una de sus mitocondrias.⁽⁹⁾

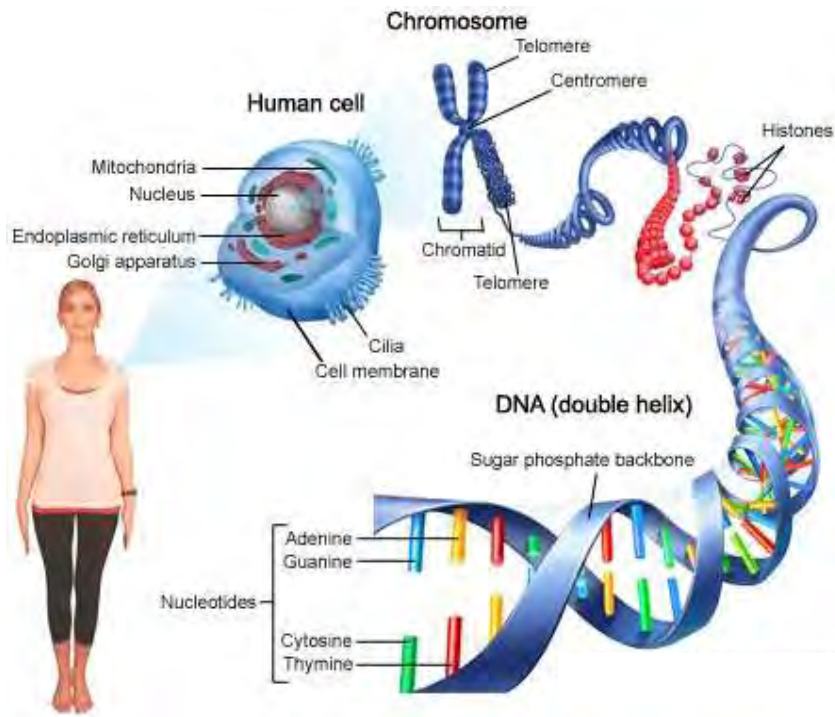


Figura 1. Organización de ADN en el ser humano. Tomado de Demonstrate understanding of biological ideas relating to genetic variation. PassBiology.⁽¹¹⁾

1) Componentes y estructura del ADN

El ADN es una molécula larga, como en escalera, que forma una doble hélice. Cada cadena de la hélice es una molécula lineal formada por nucleótidos. En el ADN hay cuatro nucleótidos diferentes. Cada nucleótido del ADN tiene una de las cuatro bases nitrogenadas -A (adenina), G (guanina), T (timina) o C (citosina). Estas cuatro bases constituyen el alfabeto genético, que en distintas combinaciones especifican finalmente la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Unos de los grandes descubrimientos del siglo XX fue llevado a cabo en 1953 por James Watson y Francis Crick, que establecieron que las dos cadenas del ADN son complementarias entre sí, de tal manera que los peldaños de la escalera de la doble hélice constan de los pares de bases A=T o G=C. Esta relación complementaria entre adenina y timina y entre guanina y citosina es esencial para la función génica. Esta relación sirve de base tanto para la replicación del ADN como para la expresión génica. Durante ambos procesos, las cadenas del ADN sirven de molde para la síntesis de moléculas complementarias. En la Figura 2 se muestran dos representaciones de la estructura y los componentes del ADN.⁽¹²⁾

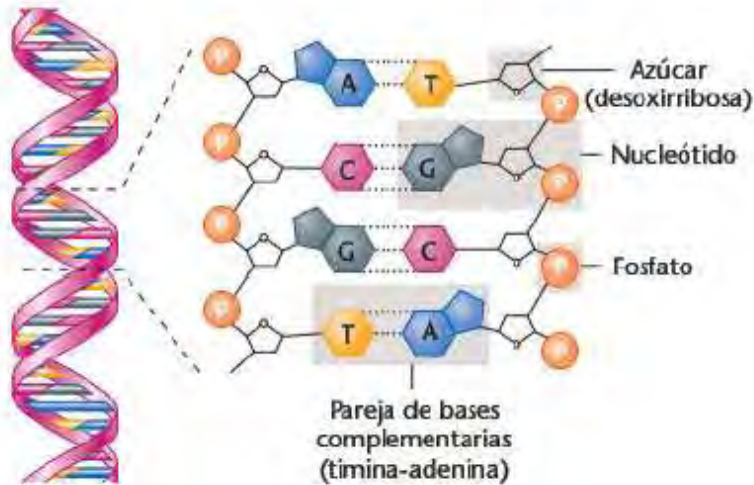


Figura 2. Esquema de la estructura del ADN, que ilustra la naturaleza de la doble hélice (a la izquierda) y los componentes químicos que forman cada cadena (a la derecha). Tomado de Klug WS, Cummings MR. Conceptos de genética (1998).⁽¹²⁾

El conjunto del ADN que posee cada célula se denomina <genoma>, y en el ser humano está conformado por unos 6.000 millones de pares de bases, que en el organismo se disponen de modo irregular en 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (XX o XY) que se hallan en el interior del núcleo, según se observa en la Figura 3, en lo que conocemos como cariotipo. En el interior del núcleo celular el ADN se encuentra unido a una serie de proteínas, formando parte de la cromatina. La cromatina está formada por un material filamentososo que se agrupa de manera diferente según el ciclo vital de la célula y/o su estado funcional, de tal modo que es durante la división celular cuando aparece en la forma clásicamente conocida de cromosomas.⁽¹³⁾

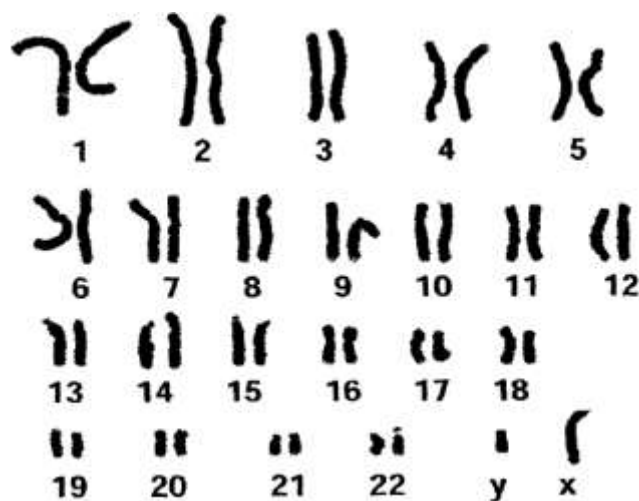


Figura 3. Cromosomas, el cariotipo. Tomado de Lorente JA, Acosta JAL. Un Detective llamado ADN: tras las huellas de criminales, desaparecidos y personajes históricos (2004).⁽¹³⁾

2) Estructura del genoma humano

El genoma humano globalmente puede ser analizado a partir de sus elementos estructurales y de sus elementos funcionales. Los primeros corresponden por ejemplo a regiones codificantes de proteínas y a regiones no codificantes; los segundos a los componentes que participan en interacciones, regulación y función biológica. Dentro del genoma humano se encuentran 23,000 genes o regiones codificantes de proteínas (similar al número de genes en otros mamíferos y en algunas plantas); constituidos por exones e intrones en una proporción de secuencias de 1:24. El genoma humano a diferencia de genomas de otros organismos cuenta con mayor cantidad de segmentos o regiones duplicadas; las secuencias repetitivas del genoma humano corresponden a diferentes tipos de regiones: transposones, regiones intergénicas, seudogenes, repeticiones cortas, repeticiones largas y repeticiones en tándem, Figura 4.⁽¹⁴⁾

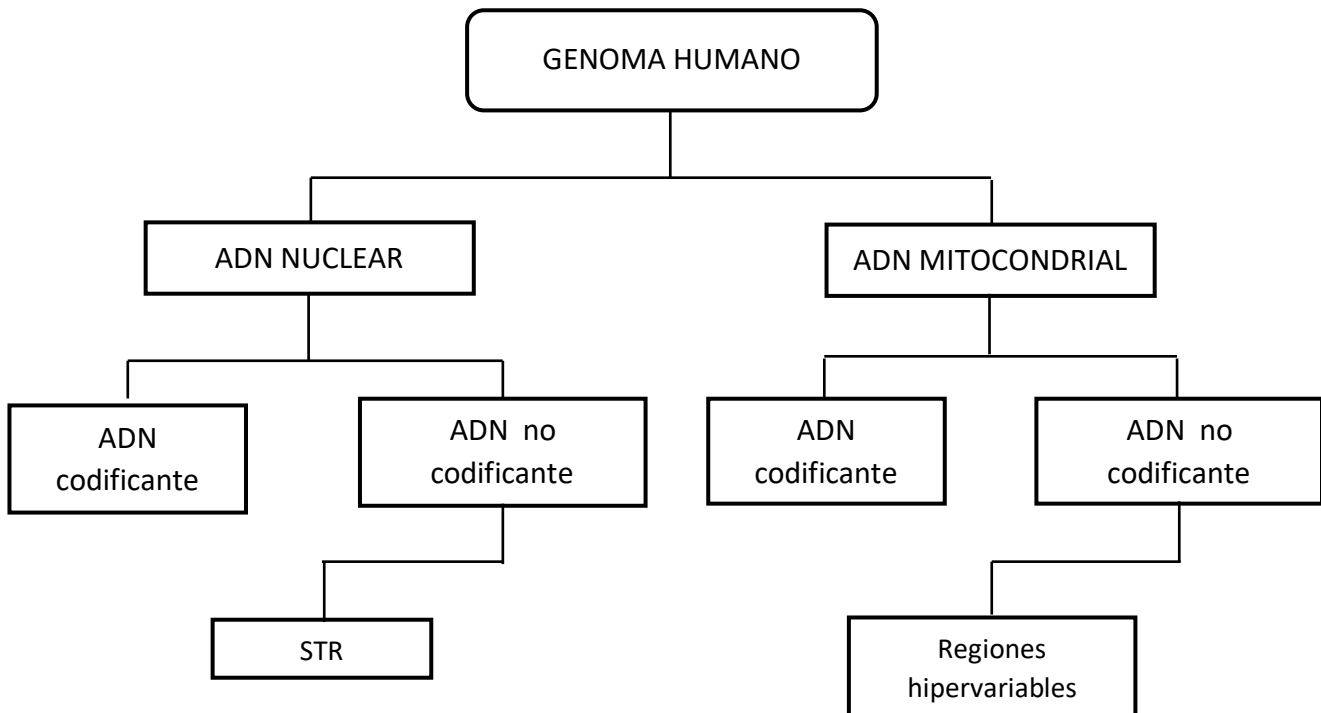


Figura 4. Clasificación del ADN en función de su estructura. Modificado de Lorente JA, Acosta JAL. Un Detective llamado ADNA: tras las huellas de criminales, desaparecidos y personajes históricos (2004).⁽¹³⁾

2.1) ADN codificante

El que conforma los genes, el código genético capaz de transformarse o expresarse en aminoácidos y proteína. Supone aproximadamente un 10 por ciento del total del ADN. El ADN codificante o expresivo está compuesto por los diferentes genes que definirán las características de las personas a través de las proteínas, un proceso que determina una secuencia de aminoácidos que sirve para codificar los genes no sólo en cada tejido orgánico, sino en cada momento preciso.⁽¹³⁾

2.2) ADN no codificante

El que no transmite información en forma de aminoácidos y proteínas, lo cual no significa que no tenga utilidad. Supone un 90 por ciento del total del genoma humano. En algunas ocasiones fue llamado <ADN basura> por no tener una función especial en lo referente a los genes.⁽¹³⁾

2.2.1) Repeticiones en tándem

Dos categorías importantes de repetición en tándem se han utilizado ampliamente en la genética forense: minisatélites, también conocidos como Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR); y microsatélites, también conocidos como Repeticiones Cortas en Tándem (STR). La estructura general de mini y microsatélites es la misma, Figuras 5 y 6. La variación entre alelos diferentes es causada por un número diferente de la unidad de repetición, que a su vez da como resultado alelos que son de diferentes longitudes; es por esta razón que los polimorfismos de repetición en tándem también se conocen como polimorfismos de longitud.⁽¹⁵⁾

2.2.1.1) Minisatélites

Para los minisatélites la unidad de repetición va de 10 a 100 pb. La mayoría de los polimorfismos minisatélites se detectan mediante enzimas de restricción. La identificación de los VNTR se hace con la utilización de sondas complementarias sintéticas que hibridan con la secuencia de ADN, propia del VNTR en estudio. Estas sondas pueden ser “mono locus”, que hibridan en una sola región de ADN, y las “multi locus”, que hibridan en forma simultánea con varias regiones. Los análisis con minisatélites contienen varias limitaciones, entre las cuales sobresalen: el tiempo que se invierte en cada estudio (tres semanas), la elevada concentración de ADN que deben tener las muestras, y la poca eficiencia del estudio cuando se trata de muestras con ADN degradado, por el mayor tamaño del ADN que se examina.⁽¹⁶⁾

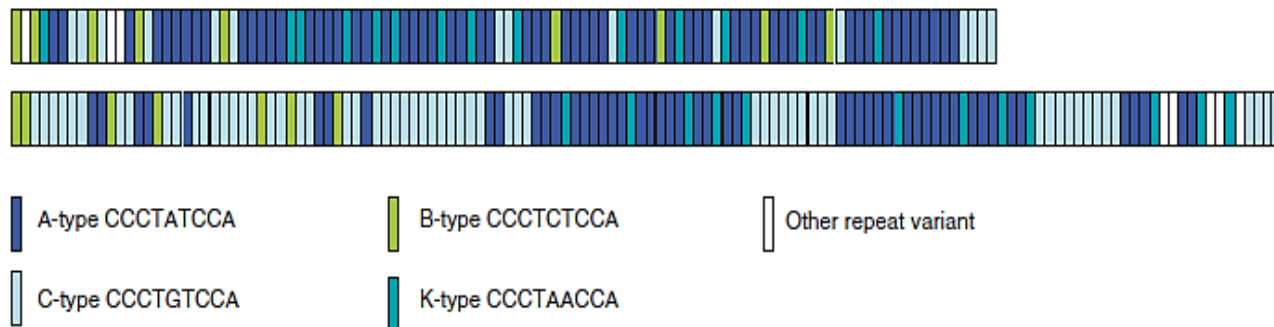


Figura 5. La estructura de dos alelos minisatélites encontrados en el locus D1S7. Los alelos son relativamente cortos y contienen 104 y 134 repeticiones; los alelos en este locus pueden contener más de 2000 repeticiones. Los alelos están compuestos por variantes diferentes de la repetición central de 9 pb; esta es una característica común de los alelos minisatélites. Tomado de Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics (2011).⁽¹⁵⁾

2.2.1.2) Microsatélite

Una categoría importante de ADN repetitivo es el ADN microsatélite, formado por secuencias pequeñas de hasta 400 pb. Estas secuencias también denominadas STRs tienen una unidad de repetición que va entre 2 y 7 pb y se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma. Con base en la longitud, el número de repeticiones y la variabilidad que presentan estas secuencias, se les ha denominado STRs simples, complejos y compuestos o STRs con baja, intermedia y alta microvariabilidad. Son una fuente rica de marcadores polimórficos que pueden detectarse mediante PCR. Los alelos de los loci STR pueden diferenciarse por el número de copias de la secuencia repetida presente en la región amplificada y se distinguen de otros utilizando detección radiactiva, o fluorescente después de la separación electroforética.⁽¹⁷⁾

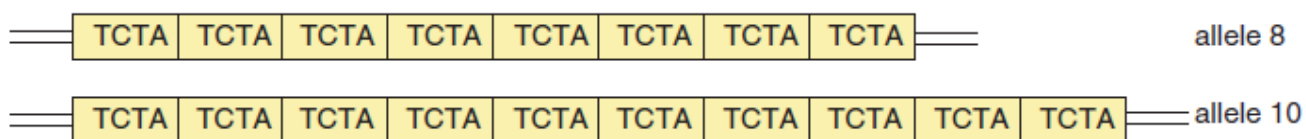


Figura 6. La estructura de una breve repetición en tándem. Este ejemplo muestra la estructura de dos alelos del locus D8S1179. El ADN a cada lado de las repeticiones centrales se denomina ADN de flanco. Los alelos se nombran de acuerdo con el número de repeticiones que contienen, de ahí los alelos 8 y 10. Tomado de Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics (2011).⁽¹⁵⁾

3) Polimorfismo

Alelo es el término que define a formas alternativas de un gen o de un *locus*, y *locus* se utiliza para designar una posición o localización específica de un gen en un cromosoma. La coexistencia de alelos múltiples en un locus se denomina polimorfismo genético. Por definición, cualquier sitio en el cual existen alelos múltiples como componentes estables de la población, es polimórfico. En otras palabras, el polimorfismo expresa la variabilidad que existe dentro de un fragmento de ADN. Como regla general, cuantos más alelos haya, mayor polimorfismo y, por ende, mayor poder de identificación.⁽⁹⁾ Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición por lo que pueden dividirse en 2 tipos, Figura 7.

- Polimorfismos de secuencia: Se producen por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN codificante.
- Polimorfismos de longitud. Se producen por la inserción o delección de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini y microsatélite. Algunos se caracterizan por tener una secuencia que se repite varias veces, en tándem. Otros por si hay inserción o delección en un cierto fragmento de ADN o bien, si hubo inserción o no de ciertas secuencias en un determinado fragmento de ADN. Estos tipos de polimorfismo se presenta en su mayor proporción, en regiones no codificantes, lo cual hace que diferencias en las secuencias de ese ADN no sean raras y se transmitan como tal a la descendencia, por lo que son comúnmente utilizados como marcadores genéticos en la identificación humana ^(5, 9)

Polimorfismo de secuencia

-----AIGCAACGTA-----
-----AGGCAAIGTA-----

Polimorfismo de longitud

----- (TGCC)(TGCC)(TGCC) -----
3 repeticiones
----- (TGCC)(TGCC) -----
2 repeticiones

Figura 7. Tipos de polimorfismo: de secuencia y de longitud. Tomado de Rodríguez C, Rodarte B, Monter M, Coss A, Castañeda A, Rodríguez R. Genética forense (2010).⁽¹⁸⁾

4) Técnicas de análisis de polimorfismo

Desde hace poco más de una década, la tecnología del ADN ha permitido el estudio de la variabilidad humana mediante el análisis directo del propio material genético y no a través del análisis de las proteínas codificadas por éste. Continuamente se están desarrollando métodos y técnicas de análisis de ADN en todos los procesos: extracción, purificación, cuantificación y amplificación de marcadores genéticos utilizados en el tipado de ADN. También hay pasos importantes previos al análisis de ADN, como la búsqueda y localización de evidencias e indicios que son sometidos a pruebas de orientación para conocer la naturaleza de éstos, que van a determinar considerablemente el éxito de la obtención de resultados.⁽⁵⁾

4.1) Pruebas de orientación

Los fluidos corporales encontrados en la escena del crimen pueden proporcionar información importante su reconstrucción al respaldar un vínculo entre los que tomaron muestras y los actos delictivos reales, estos pueden ser: sangre, semen, saliva, orina, sudor, lágrimas etc., todos ellos son trascendentes para identificar a la víctima, al probable agresor, o incluso exonerar a un individuo de un delito que no ha cometido, la mayoría de los fluidos encontrados contienen información valiosa por la presencia de ADN. La pruebas de detección de manchas desconocidas se lleva a cabo cuando existen cantidades muy pequeñas debido a que tienden a degradarse en condiciones ambientales, de ahí que el investigador forense debe escoger un método para identificar un fluido en específico ya que unos llegan a ser invisibles a simple vista (por ejemplo manchas de saliva). Cada tipo de fluido encontrado en la escena de un crimen tiene un método de detección que puede ser de naturaleza presuntiva o confirmativa. El problema con la mayoría de las pruebas, es la destrucción de las muestras, de aquí la importancia de la selección del método para identificar el tipo de fluido sin tener que destruirla, y realizar otros análisis diferentes, por ejemplo las pruebas de identificación genética, ya que es de vital importancia y puede ser decisivo en un caso, muchas de las técnicas utilizadas han existido por mucho tiempo y han ido evolucionando como las pruebas químicas, métodos inmunológicos, prueba de actividad catalítica de proteínas, métodos espectroscópicos y microscopía.^(19, 20)

4.1.1) ABACard® HemaTrace

La sangre es uno de los tipos más valiosos de evidencia física que se puede encontrar en cualquier escena del crimen. Al individualizarse como una huella dactilar, la sangre no sólo puede vincular a un individuo con una escena, sino que también puede proporcionar la secuencia de eventos que podrían haber ocurrido. La práctica estándar de la Ciencia Forense en la escena del crimen es que el investigador realice un mínimo de una prueba presuntiva de identificación de sangre durante el proceso de recopilación de pruebas. La práctica tradicional estándar en el laboratorio de Genética Forense es que el científico repita la prueba presuntiva de sangre; luego confirme la muestra como sangre humana antes de continuar con una prueba de ADN. Los avances actuales en la identificación de sangre humana permiten a los investigadores y laboratorios confirmar la especificidad humana de la muestra de sangre en minutos.⁽²¹⁾

La sangre consta de elementos formes que están suspendidos en un líquido llamado plasma y que son transportados en el mismo. Los elementos formes —eritrocitos, leucocitos y plaquetas— funcionan, respectivamente, en el transporte de oxígeno, la defensa inmunitaria y la coagulación de la sangre, Figura 8. Los eritrocitos son con mucho los más numerosos. Un milímetro cúbico de sangre normalmente contiene 5.1 a 5.8 millones de eritrocitos en varones, y 4.3 a 5.2 millones de eritrocitos en mujeres. En contraste, el mismo volumen de sangre sólo contiene 5000 a 9000 leucocitos, en ambos sexos.⁽²²⁾

Los eritrocitos tienen dos propiedades importantes; contienen hemoglobina y no contienen un núcleo. La hemoglobina es la proteína blanco para muchos productos de detección de sangre en el ámbito forense; la falta de un núcleo significa que los glóbulos rojos no son el objetivo para la detección del ADN. Sin embargo, es la pequeña cantidad de leucocitos la que contiene el material genético.^(21, 22) Los leucocitos forman sólo el 1-2% de todas las células sanguíneas con 6.6 pg de ADN por célula. Además, la sangre contiene típicamente 150 mg/mL de hemoglobina y 60–80 mg/mL de proteínas plasmáticas.⁽²³⁾

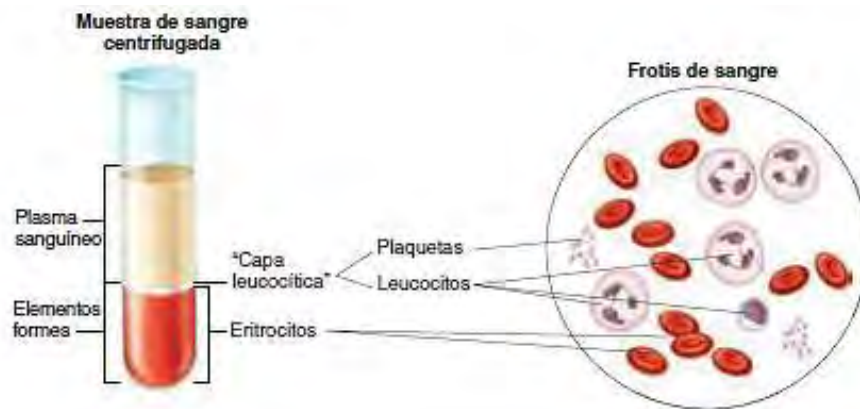


Figura 8. Constituyentes de la sangre. Los eritrocitos son los más abundantes de las células sanguíneas, los leucocitos y las plaquetas sólo forman una “capa leucocitaria”. Tomado de Fox S. Fisiología humana (2011).⁽²²⁾

El ABACard® HemaTrace® es un dispositivo de prueba utilizado para la identificación de sangre humana mediante la detección de la presencia de hemoglobina (Hb) humana. Si la hemoglobina humana está presente en la muestra, sus antígenos reaccionarán con los anticuerpos móviles monoclonales antihumanos de la Hb en el área marcada con "S". Esto formará un complejo móvil antígeno-anticuerpo que migrará a través del dispositivo hacia el área marcada "T", de prueba. El área "T" contiene anticuerpos policlonales antihumanos inmóviles que capturan el complejo anticuerpo-antígeno móvil. Esto formará un sándwich anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos se marcan con un colorante de color rosa y sobre la agregación de estos anticuerpos, se forma una línea rosa en la zona de "T" que indica la presencia de hemoglobina humana en la muestra. Este dispositivo de prueba también contiene un control positivo interno. En el área marcada "C" hay anticuerpos anti-inmunoglobulina inmóviles que se unen los anticuerpos monoclonales de Hb antihumanos que no se unen a los anticuerpos en la zona de "T". Las partículas de colorante rosado capturadas formarán una línea rosa en el área "C", lo que indica que la prueba funcionó correctamente, Figura 9. La presencia de dos líneas rosadas, una en el área "T" y una en el área "C" indica un resultado positivo. La presencia de una sola línea rosa en el área "C" indica un resultado negativo. Si no hay una línea rosa en el área "C", la prueba no es válida.⁽²⁴⁾

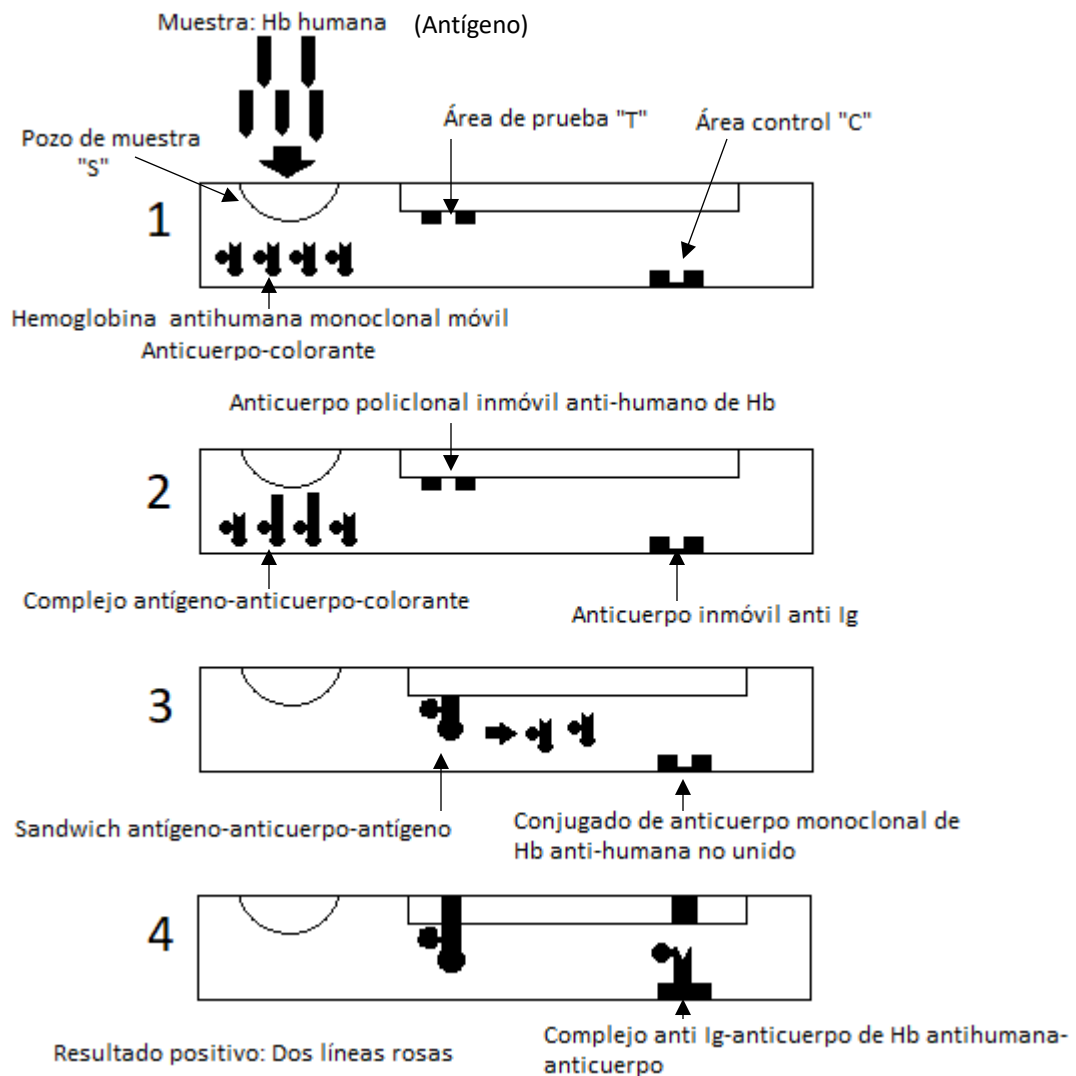


Figura 9. ABACard® HemaTrace. Modificado de Johnston S, Newman J, Frappier R. Validation Study of the Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace® Membrane Test for the Forensic Identification of Human Blood (2003).⁽²⁵⁾

4.1.2) ABACard® p30

El semen aplica principalmente cuando se trata de delitos sexuales, se puede encontrar como mancha o fluido sobre la ropa, el propio sospechoso o la víctima. El semen es una sustancia color blanco y viscoso compuesto por aminoácidos, azúcares, sales, iones y otros componentes orgánicos e inorgánicos en cuya elaboración participa principalmente, la vesícula, la glándula prostática, las glándulas de Cowper y los testículos, además consta de los siguientes elementos: células espermáticas o espermatozoides, células no espermáticas, como leucocitos y células epiteliales del tracto urinario, que aunque en pequeño porcentaje, también están presentes en el semen y el plasma seminal cuya misión es servir de soporte, vehículo, medio de nutrición y estabilidad del espermatozoide.^(26, 27)

La determinación de origen y especie de este fluido, detectando actividades enzimáticas en el líquido seminal (detección de la actividad de la fosfatasa ácida) y la presencia o no del factor proteico humano p30, así como la visualización microscópica de los espermatozoides mediante una tinción de color para su resalte, le permite al laboratorio de Genética Forense afirmar que se trata de semen humano. ^(26, 27)

La prueba ABACard® p30 permite la detección cualitativa de p30 (antígeno prostático específico) para la identificación forense del semen humano, incluidas las muestras de semen vasectomizadas y azoospermicas. En la prueba ABACard® p30, la proteína p30 reacciona con el anticuerpo monoclonal p30 antihumano móvil (enlazado con partículas de colorante) formando un complejo móvil antígeno-anticuerpo. Este complejo móvil luego migra hacia la zona de prueba ("T") donde se encuentra un anticuerpo policlonal anti-p30 inmóvil. Cuando el anticuerpo inmóvil capture el complejo anterior se formará un sándwich anticuerpo-anticuerpo-antígeno. ^(28, 29)

Si la proteína p30 está presente, se formará una banda de color rosa en el área de prueba "T". Un área de control positivo interno ('C') indica que la prueba ha funcionado correctamente y se han seguido los procedimientos adecuados. El complejo de anticuerpo p30 migrante no se unirá al anticuerpo en el área "T" pero se unirá a un anticuerpo anti-inmunoglobulina inmovilizado en el área "C" de control. Las partículas de colorante rosa capturadas formarán una línea rosa en esta área. Una sola línea de color rosa en el área de control "C" indica un resultado negativo, mientras que dos líneas de color, una en el área de prueba "T" y otra en el área de control "C" indican un resultado positivo (siempre que no haya efecto "High Dose Hook"). ^(28, 29)

4.1.3) SALIgAE®

Las manchas de saliva pueden jugar un papel importante en la investigación forense de crímenes violentos. Una vez detectado, el ADN de una mancha de saliva puede remontarse a un individuo y proporcionar evidencia valiosa en su enjuiciamiento. Debido a que la saliva se encuentra y se recolecta con mucha menos frecuencia que la sangre o el semen en materiales probatorios, ha recibido menos atención e investigación; por lo tanto, muchos laboratorios rara vez usan pruebas de saliva.

La saliva es un líquido de la cavidad bucal, producida por las glándulas salivales, transparente, de viscosidad variable, compuesto principalmente por agua, sales minerales y algunas proteínas. La saliva en si no presenta contenido celular, pero la saliva se encuentra en un medio lleno de células epiteliales. Estas células se desprenden y llegan a formar parte de la saliva, por ejemplo de un chicle o de una boquilla de cigarrillo, se pueden encontrar células adheridas que se han desprendido del epitelio labial o células que fueron arrastradas por la saliva.⁽³⁰⁾

La amilasa es un compuesto que se encuentra en los fluidos corporales de los humanos, así como en todos los primates y en la mayoría de los mamíferos. Hay dos formas de amilasa, pancreática y salival, que se encuentran en los fluidos corporales humanos. Estas amilasas estructuralmente diferentes están codificadas por loci separados en el cromosoma 1. Aunque la distribución de la amilasa pancreática y salival puede variar en los fluidos corporales, se ha informado que la amilasa salival se encuentra en la saliva, la transpiración y la leche materna. La amilasa pancreática se encuentra en el semen, las heces y las secreciones vaginales. La amilasa salival es la forma particular que se enfoca en la identificación forense de la saliva. La amilasa salival se produce en las glándulas salivales y comienza la digestión del almidón en la boca. La mayoría de los métodos antiguos para la detección forense de saliva no pueden distinguir entre amilasa salival y pancreática.^(26, 31)

La prueba de saliva SALIgAE® de Abacus Diagnostics ofrece una nueva alternativa a las pruebas de amilasa del pasado. Es una solución que cambia de color con la adición de un extracto que contiene saliva. El mecanismo exacto de la prueba SALIgAE® no se conoce debido a su naturaleza patentada. Esta prueba es precisa en la identificación de la saliva, proporciona a cualquier laboratorio forense una herramienta valiosa para localizar e identificar este valioso tipo de evidencia. La prueba SALIgAE® es una prueba simple de fácil uso, no requiere preparación de reactivos, no requiere equipo adicional, no requiere altas temperaturas de incubación, se completa en 10 minutos, es estable y sencilla de realizar. La reacción de la saliva con SALIgAE® da como resultado la formación de una solución amarilla fácil de percibir a simple vista, Figura 10.^(31, 32)



Figura 10. Resultados de la prueba SALigAE®. Tomado de Saliva Identification Test. Abacus Diagnostics (2011).⁽³³⁾

4.2) Extracción y purificación

Una muestra biológica obtenida de una escena del crimen en forma de una mancha de sangre, semen o una muestra de tejido de un individuo contiene gran cantidad de sustancias, además del ADN. Las proteínas celulares que empaquetan y protegen el ADN de la célula pueden inhibir la capacidad de analizar el ADN. Por lo tanto, los métodos de extracción y purificación se han desarrollado para separar las proteínas y otros materiales celulares de las moléculas de ADN. Idealmente, estos procesos eliminan los inhibidores del ADN que reducen o evitan la amplificación de la PCR. El proceso de extracción también debe producir una solución estable que contenga ADN de alta calidad que no se degradará con el tiempo durante el almacenamiento de la muestra.⁽³⁴⁾

Los objetivos del proceso de extracción de ADN suelen ser (1) lisar células para liberar las moléculas de ADN, (2) separar las moléculas de ADN de otras células y (3) aislar el ADN en un formato compatible con aplicaciones posteriores, incluida la amplificación por PCR. La cantidad y calidad del ADN a menudo deben medirse antes de continuar con los procedimientos analíticos para garantizar resultados óptimos.⁽³⁴⁾

Todas las muestras deben manejarse con cuidado, independientemente del método de extracción de ADN para evitar la contaminación de muestra a muestra o la introducción de ADN extraño. El proceso de extracción es probablemente donde la muestra de ADN es más susceptible a la contaminación en el laboratorio que en cualquier otro momento en el proceso de análisis forense de ADN. Por esta razón, los laboratorios generalmente procesan las muestras de evidencia en momentos separados y, a veces, incluso en ubicaciones diferentes de las muestras de referencia.⁽³⁴⁾

Hay muchos métodos disponibles para extraer ADN. La elección del método que se utilizará depende de una serie de factores, incluidos el tipo y la cantidad de muestra; la velocidad y, en algunos casos, la capacidad de automatizar el procedimiento de extracción; la tasa de éxito con muestras forenses, que es el resultado de extraer la cantidad máxima de ADN de una muestra y, al mismo tiempo, los químicos que se usan en la extracción: la mayoría de los laboratorios hacen todo lo posible para evitar el uso de productos químicos peligrosos.^(15, 34)

4.2.1) Tissue and Hair Extraction Kit

Tissue and Hair Extraction Kit está diseñado para obtener ADN bicatenario o monocatenario a partir de una gran variedad de tejidos y cabello cuando se usa junto con el sistema DNA IQ™. Estos tipos de muestra requieren un pretratamiento para asegurar la lisis completa antes de la purificación del ADN con el sistema DNA IQ™; el uso de dithiothreitol (DTT) y proteinasa K como parte del método de extracción garantizan la lisis de la muestra y la eliminación de proteínas y otros componentes. El pelo es rico en puentes disulfuro por lo que requiere la adición de un agente reductor como el DTT que romperá estos puentes y permitirá que la proteinasa K digiera la proteína del cabello y libere los ácidos nucleicos atrapados.⁽³⁵⁾

Además es importante mencionar que las muestras de pelo deben ser sometidas a lavados previos a la extracción para eliminar ADN extraño, es decir, ADN que no sea del donador de la muestra, ya que contiene niveles muy bajos de ADN, es propenso a la contaminación, pero a diferencia de muchos otros tipos de evidencia biológica con bajos niveles de ADN, es posible limpiar el tallo del cabello antes de la extracción del ADN. Tissue and Hair Extraction Kit sirve para la extracción de ADN genómico y mitocondrial de folículos capilares, cabellos sin raíz y de ADN genómico de tejido embebido en parafina o fijado con formalina.^(15, 35-37)

4.2.2) Extracción de ADN de hueso con Bone Incubation® Buffer

En casos históricos, identificación de personas desaparecidas, desastres masivos e investigaciones de ADN antiguas, las muestras de huesos a menudo son el único y casi siempre el mejor material biológico disponible para la tipificación de ADN. Debido a los bajos niveles de ADN endógeno, daño al ADN ambiental, bacteriano y post mórtem, así como a la presencia potencial de inhibidores del medio ambiente que se extraen conjuntamente con ADN, la recuperación de datos de ADN de muestras degradadas representa un desafío significativo.⁽³⁸⁾

El hueso es un tejido compuesto por células y sustancia extracelular, también llamada matriz ósea. Las células pueden ser de varios tipos: células osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos y la matriz extracelular está formada por un 70% de hidroxapatita mineral inorgánica, que incluye fosfato de calcio, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, hidróxido de calcio y citrato y un 30% de materia orgánica como fibras de colágeno. Las áreas de mineralización extensa dentro del hueso representan barreras físicas para los reactivos de extracción y, por lo tanto, impiden la liberación de moléculas de ADN, por lo que es necesario utilizar reactivos como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA desmineraliza el hueso (hasta cierto punto depende de la concentración de EDTA como del volumen) e inactiva las ADNasas mediante quelación de cationes bivalentes, como Mg^{+2} o Ca^{+2} .⁽³⁸⁾

El protocolo de Bone Incubation® Buffer está diseñado para procesar muestras de hueso pulverizado o laminado para la extracción y purificación de ADN utilizando el sistema DNA IQ™. El ADN purificado resultante puede usarse como molde en reacciones de amplificación tanto para secuencias genómicas como mitocondriales. El uso de Bone Incubation® Buffer, en conjunto con proteinasa K y DTT, fue probado externamente en restos de fosas comunes bajo diversas condiciones del suelo, pero debido a la naturaleza de este tipo de muestra, es decir, las muestras pueden haber estado expuestas a factores ambientales durante largos períodos de tiempo y la cantidad de material biológico, el ADN no se pudo obtener de todas las muestras. El hueso debe procesarse para extraer eficientemente el ADN. El éxito de la extracción depende del tratamiento previo a la extracción, que se puede lograr mediante la eliminación de calcio usando EDTA, como se mencionó anteriormente y la pulverización o laminado del hueso. El proceso de extracción funciona de manera más eficiente con hueso laminado en el que las células intercaladas en la matriz ósea son más accesibles para la lisis.⁽³⁹⁾

El éxito de la purificación del ADN nuclear o mitocondrial del hueso también depende de la integridad del ADN. Las condiciones del suelo y la humedad tienen un profundo efecto en la calidad del ADN. La resina DNA IQ™ elimina fragmentos de ADN muy pequeños, que pueden actuar como inhibidores de la PCR, lo que lleva a mejores resultados de amplificación. Sin embargo, si el ADN se degrada en fragmentos muy pequeños, no se obtendrá ADN. Con el sistema DNA IQ™, se aislará ADN microbiano además del ADN humano, por lo que es aconsejable lavar el hueso antes de empezar el proceso de descalcificación, especialmente al examinar el ADN mitocondrial.⁽³⁹⁾

4.2.3) DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 Forensic Instrument

Las aplicaciones del análisis de ADN forense se han ampliado en su alcance y han progresado rápidamente en la última década. El crecimiento en la cantidad y variedad de muestras probadas se debe en gran parte al desarrollo de sistemas de tipaje multiplex STR que permiten tipear rápidamente pequeñas cantidades de material biológico, produciendo resultados que ofrecen un alto nivel de discriminación. Una gran ventaja de la multiplexación STR sobre otras técnicas es que es susceptible de automatización. Mientras que varios sistemas robóticos han sido validados para los diversos aspectos de extracción, cuantificación, amplificación y electroforesis de ADN, muchos de estos se basan en un formato de 96 pocillos. Aunque son útiles para laboratorios de alto rendimiento y de base de datos, estos sistemas a menudo no son factibles para aplicaciones en laboratorios más pequeños. Si bien todos los laboratorios podrían beneficiarse de la automatización de procesos, los laboratorios pequeños tienen restricciones de espacio y/o recursos. Estas limitaciones pueden dificultar la instalación de instrumentos de gran tamaño, lo que también puede no ser factible debido al costo de mantenimiento y los consumibles necesarios para operar continuamente la instrumentación de alto rendimiento para los conjuntos de muestras que no utilizan la capacidad máxima del instrumento.⁽⁴⁰⁾

El instrumento Maxwell® 16 está diseñado para la purificación rápida y automatizada de extractos de ADN de muestras de casos forenses. Estas muestras incluyen manchas de sangre, manchas de semen, pelo, boquilla de cigarrillos y muestras de tejido encontradas regularmente en análisis de ADN forense. Dado que el tamaño del instrumento es de aproximadamente 12 "x 15", este sistema es ideal para laboratorios donde se realiza un procesamiento de lotes pequeños en muestras de casos. El instrumento está equipado con métodos preprogramados para la purificación y diseñado para su uso con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16. El instrumento puede procesar hasta 16 muestras en 30-40 minutos, después de la extracción lo que permite pasar de un elemento probatorio a un extracto de ADN purificado y listo para la amplificación en poco más de una 1 hora.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾

DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 utilizado con el Instrumento Maxwell® 16 está configurado para volumen de baja elución (LEV). Este sistema utiliza partículas paramagnéticas para capturar el ADN después de la lisis celular. Después de que se produce la lisis celular, las partículas se introducen en las muestras para unir el ADN. Después de una serie de lavados secuenciales, el ADN se eluye en un buffer de almacenamiento adecuado para la amplificación. Debido a que las partículas paramagnéticas exhiben una capacidad de unión máxima, normalizando la cantidad de partículas empleadas para la extracción de las diversas muestras, se puede esperar que la cantidad de ADN eluido durante la etapa final sea bastante uniforme entre las muestras. Teóricamente, dicha estandarización debería negar la necesidad de cuantificación de los genómicos finales después de la purificación, permitiendo al analista proceder de inmediato con la amplificación multiplex. Los magnetos del equipo se insertan en émbolos desechables que se utilizan para una sola muestra durante todo el proceso de purificación, lo que minimiza el riesgo de contaminación de muestra a muestra. El DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 Forensic Instrument viene con cartuchos que están sellados para contener alícuotas precargadas de soluciones de purificación. El cartucho de muestra y el proceso de purificación se ilustran en la Figura 11.⁽⁴⁰⁾



Figura 11. Maxwell® 16 Instrument y el proceso de purificación con DNA IQ™ Casework Pro Kit. Tomado de Maxwell® 16 System. Promega (2012).⁽⁴³⁾

4.2.4) Papel FTA

Otro enfoque para la extracción de ADN implica el uso de papel FTA. A fines de los años ochenta, Lee Burgoyne, de la Universidad de Flinders en Australia, desarrolló el ensayo de FTA como método para el almacenamiento de ADN. El papel FTA es un papel absorbente a base de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas para proteger las moléculas de ADN de la degradación por nucleasas y preservar el papel del crecimiento bacteriano. Como resultado, el ADN en el papel FTA es estable a temperatura ambiente durante varios años.⁽³⁴⁾

El uso de papel FTA simplemente implica agregar una mancha de sangre al papel y permitir que la mancha se seque. Las células se lisan al contacto con el papel y el ADN de los leucocitos se inmoviliza dentro de la matriz del papel. Se saca un fragmento de la mancha de sangre del papel FTA y se coloca en un tubo para lavarlo. El ADN unido puede luego purificarse lavándolo con reactivo de purificación FTA para eliminar la hemoglobina y otros inhibidores de la reacción de PCR. Esta purificación del papel puede verse visualmente porque a medida que se lava el papel, el color rojo de la hemoglobina se elimina con el sobrenadante, Figura 12. El fragmento de papel FTA se agrega directamente a la reacción de PCR, en algunos casos realizar el lavado no es necesario, ya que los sistemas de amplificación múltiplex cuentan con agentes que reducen la acción de inhibidores.⁽³⁴⁾

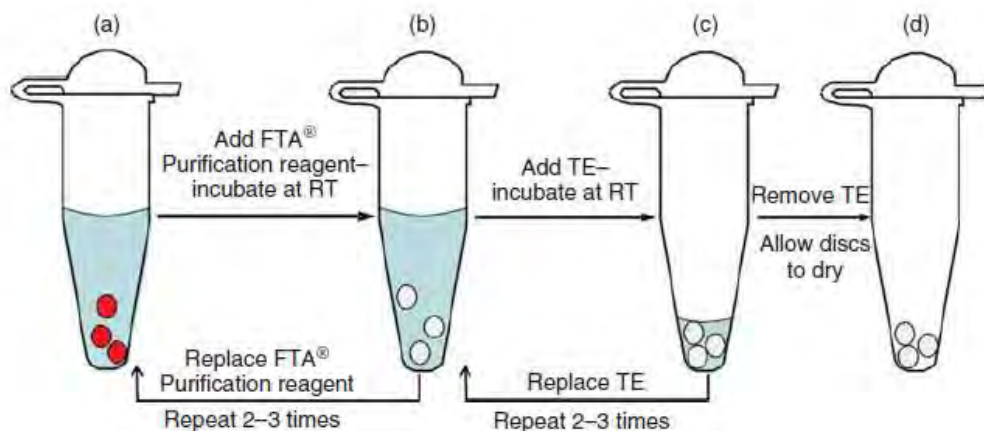


Figura 12. Extracción de ADN de la sangre en papel FTA. (a) Los fragmentos del papel FTA son generalmente de 1,2 mm o 2 mm de diámetro, uno o más fragmentos se añaden al reactivo de purificación FTA, se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. (b) El líquido se elimina y reemplaza con reactivo de purificación nuevo; este proceso se repite dos o tres veces. (c) Los fragmentos se lavan luego dos o tres veces en buffer TE. (d) Finalmente, se elimina el buffer y los fragmentos de papel FTA, que contienen el ADN, se dejan secar a temperatura ambiente o con calor suave (aproximadamente 50 °C). Los fragmentos ahora se pueden agregar directamente a una reacción de PCR. Tomado de Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics (2011).⁽¹⁵⁾

4.3) PCR en tiempo real o cuantitativa

Después de extraer el ADN es necesario conocer la cantidad de ADN presente, así como calidad del mismo. La adición de una cantidad óptima de ADN para PCR producirá mejores resultados en un menor tiempo; la adición de demasiado ADN o una cantidad insuficiente, dará lugar a un perfil que será difícil o incluso imposible de interpretar. Esto es especialmente importante cuando se trata de evidencias, cuando es muy difícil conocer el estado de conservación del material biológico y, en muchos casos, es difícil estimar la cantidad que se ha recogido de material celular. Es menos importante cuantificar ADN utilizando muestras de referencia, donde se espera una cantidad similar de ADN en cada extracción, ya que no existen muchas variables, la determinación de la cantidad de ADN en una muestra se puede realizar mediante PCR en tiempo real.⁽⁹⁾

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV. Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, que se mencionará más adelante, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción.⁽⁴⁴⁾

Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.⁽⁴⁴⁾

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Los reactivos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's,

magnesio, el buffer y el sistema de fluorescencia para detectar los productos amplificados que se proporcionan juntos en una solución conocida como «Master Mix», el agua es proporcionada por separado que también está libre de nucleasas.⁽⁴⁴⁾

4.3.1) Plexor® HY System

El sistema Plexor® HY es un novedoso sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN humano autosómico y Y en una muestra. La tecnología Plexor® HY aprovecha la interacción específica entre dos nucleótidos modificados para lograr un análisis de PCR cuantitativo. Uno de los *primers* de PCR contiene un nucleótido modificado (iso-dC) unido a un marcador fluorescente en el extremo 5'. El segundo *primer* de PCR no está marcado. La mezcla de reacción incluye desoxinucleótidos e iso-dGTP modificados con el quencher dabcylo. Dabcylo-iso-dGTP se incorpora frente al residuo iso-dC en el *primer*. La incorporación del dabcylo-iso-dGTP en esta posición da como resultado la reducción de la fluorescencia del dye en la cadena complementaria y, lo que permite la cuantificación durante la amplificación, Figura 13.⁽⁴⁵⁾

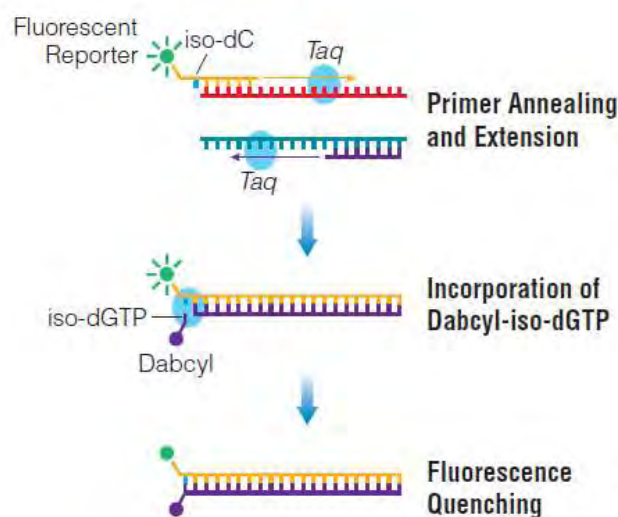


Figura 13. Proceso de PCR en tiempo real de Plexor® HY System. Tomado de Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems [Internet]. USA. Promega (2017).⁽⁴⁵⁾

Plexor® HY System incluye un control interno positivo (IPC) para controlar la inhibición en el proceso de cuantificación. Este ensayo usa tres colorantes para detectar la amplificación y un cuarto para proporcionar una señal de referencia pasiva. El objetivo autosómico es un blanco multicopia de 99 pb en el cromosoma 17. La secuencia blanco del cromosoma Y es un objetivo de 133 pb multicopia en el brazo corto del cromosoma Y. El objetivo de IPC es una secuencia

sintética añadida a todos los pozos. El IPC amplificado es de 150 pb, el amplicón más largo del ensayo.⁽⁴⁶⁾

El software de análisis asociado Plexor® HY System ha sido desarrollado para visualizar datos de amplificación de múltiples plataformas de instrumentos, trazar curvas estándar y calcular las concentraciones de ADN. Se ha incorporado un módulo de normalización STR a ese software, con entradas de usuario simples, permite que el software a) calcule los volúmenes de entrada de muestra necesarios para la amplificación en reacciones autosómicas y Y-STR, b) calcule las diluciones necesarias para las muestras concentradas y c) señale información de inhibición. Se utiliza con los sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 FAST Real-Time PCR y los sistemas Stratagene Mx3000P® y Mx3005P® QPCR.⁽⁴⁶⁾

Actualmente se cuenta con una variedad de equipos, por ejemplo Stratagene MX3005P®, que mediante una curva estándar y la medición de la fluorescencia puede determinar la cantidad de ADN que contiene cada una de las muestras analizadas. La preparación de la curva estándar y las muestras se puede realizar de manera manual, aunque se debe tener gran experiencia en la preparación de ésta, ya que influye directamente en la determinación de la concentración de las muestras, para esto existe otro sofisticado equipo llamado Biomek® 3000 que puede realizar diluciones seriadas para crear curvas estándar con el mínimo error.

4.3.2) Biomek® 3000

La identificación humana puede ser un proceso intensivo y desalentador para los laboratorios forenses con exceso de trabajo. La automatización puede proporcionar a esos laboratorios métodos normalizados para la extracción, cuantificación y normalización de ADN. La flexibilidad y la facilidad de programación permiten que Biomek® 3000 se utilice en muchas partes del proceso en el laboratorio, lo que lleva a la reducción del trabajo manual, aumentando el rendimiento y a la vez ayudando a eliminar los errores del usuario.

Biomek® 3000 proporciona una solución para la preparación de muestras forenses, después de la configuración inicial no se requiere intervención del usuario para completar el procesamiento automatizado. El Biomek® 3000 puede preparar una placa completa de 96 pozos para la purificación, cuantificación y normalización en aproximadamente una hora generando muestras de ADN listas para la amplificación, Figura 14.^(47, 48)



Figura 14. Biomek® 3000. Tomado de Second Beckman Coulter Biomek® Platform Awarded Premier Application Status by Affymetrix. Business Wire (2007). ⁽⁴⁹⁾

4.3.3) Stratagene MX3005P®

El sistema Mx3005P QPCR es un sistema integrado de amplificación, detección y análisis de datos QPCR. El diseño del sistema combina un termociclador de última generación, un sistema óptico avanzado con lámpara halógena de cuarzo-tungsteno, un tubo fotomultiplicador (PMT) y un software de análisis de datos. Se proporcionan cinco conjuntos de filtros y el diseño óptico de escaneo proporciona una separación óptima entre los colorantes y entre las muestras. El instrumento Mx3005P proporciona un formato de detección de PCR de tubo cerrado que se puede usar con todas las químicas de detección de fluorescencia, incluidos SYBR® Green y EvaGreen®, así como los sistemas TaqMan®, Molecular Beacons y Scorpions, Figura 15.⁽⁵⁰⁾

El software MxPro QPCR presenta una variedad de opciones de tipo de experimento con configuración de placa personalizada, configuración de perfil térmico y pantallas de análisis de experimentos que agilizan el proceso de recopilación y análisis de datos para aplicaciones específicas.⁽⁵⁰⁾



Figura 15. Stratagene® MX3005P. Tomado de Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems Setup and User's Guide. Agilent Technologies (2015).⁽⁵¹⁾

4.4) PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.⁽⁴⁴⁾

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs): adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión, Figura 16. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa o Electroforesis Capilar para confirmar si la reacción fue exitosa.⁽⁴⁴⁾

A continuación se explicará qué sucede en cada una de las etapas o fases:

- **Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.
- **Hibridación.** En esta etapa, los *primers* se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-*primers*, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los *primers* es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.
- **Extensión.** En esta etapa, la *Taq* polimerasa actúa sobre el complejo templado-*primers* y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis.⁽⁴⁴⁾

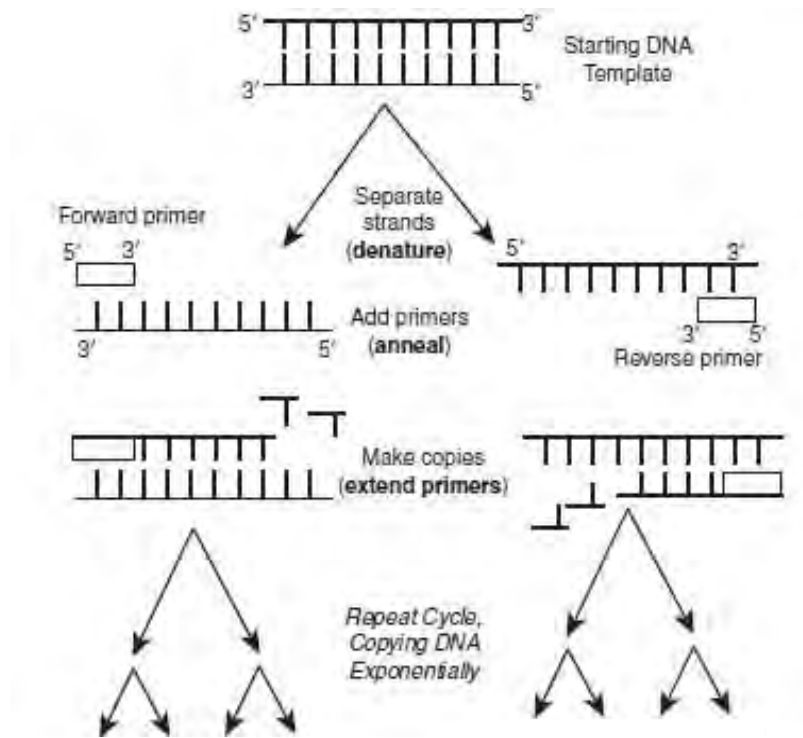


Figura 16. Proceso de amplificación de ADN con la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tomado de Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* (2005).⁽³⁾

4.4.1) PowerPlex® Fusion System

PowerPlex® Fusion es un sistema multiplex de 24 locus para aplicaciones de identificación humana que incluye análisis forense, pruebas de relación y uso de investigación. Este sistema de cinco colores permite la coamplificación y la detección fluorescente de los loci STRs CODIS y del ESS y amelogénina para la determinación del sexo. Además, se incluye el locus DYS391 específico de masculino para identificar los resultados del alelo Y nulo para amelogénina. Los loci Penta D y Penta E se incluyen para aumentar la discriminación y permitir la búsqueda de bases de datos que incluyen perfiles con estos loci Penta.⁽⁵²⁾

Finalmente, los loci D2S1338 y D19S433, que son loci populares incluidos en una serie de bases de datos, se incorporaron para aumentar aún más el poder de la discriminación. Este panel extendido de marcadores STR tiene como objetivo satisfacer las recomendaciones de CODIS y ESS, Figura 17.⁽⁵²⁾



Figura 17. Configuración del sistema PowerPlex® Fusion. Este sistema permite la co-amplificación de Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317 y Penta E marcados con fluoresceína; D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO y Penta D marcados con JOE; TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX y DYS391 marcados con TMR-ET; y D8S1179, D12S391, D19S443, FGA y D22S1045 marcados con CXR-ET. El estándar interno (ILS 500) está marcado con el colorante CC5 y contiene 21 fragmentos de ADN de 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500 bases. Tomado de PowerPlex® Fusion System. Promega (2018).⁽⁵³⁾

4.4.2) PowerPlex® Y23 System

Los marcadores de STR en el cromosoma Y (STR-Y) tienen cualidades que son distintas de los marcadores autosómicos y son útiles para la identificación humana. Los marcadores STR-Y se encuentran en la región no recombinada del cromosoma Y y producen un perfil haploide a partir de ADN masculino. Esta calidad simplifica la interpretación de la mezcla masculino/femenino al eliminar la contribución femenina de un perfil de amplificación. La estricta herencia paterna de estos marcadores los hace útiles para estudios de paternidad y parentesco. El sistema PowerPlex® Y23 permite la coamplificación y detección fluorescente de cuatro colores de 23 loci, incluidos DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643, DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 e Y-GATA-H4, Figura 18.⁽⁵⁴⁾

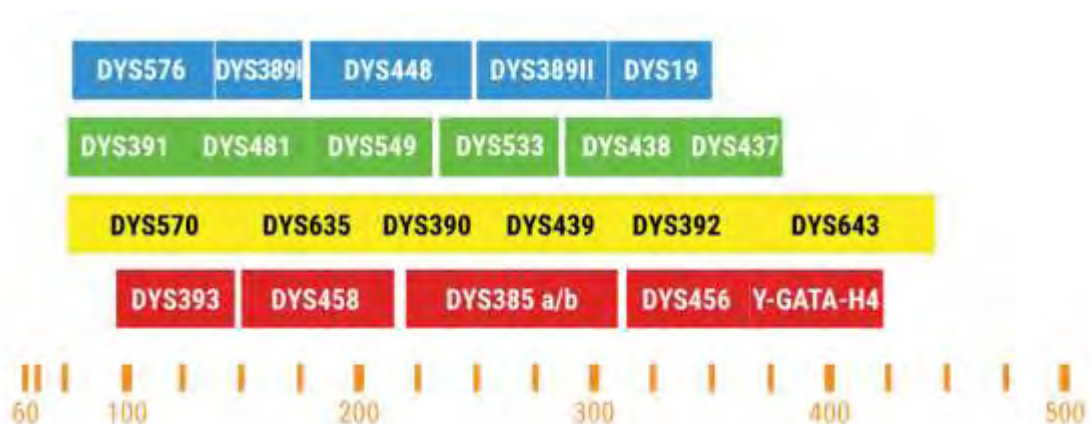


Figura 18. Configuración de PowerPlex® Y23 System. Este sistema permite la co-amplificación de DYS576, DYS389I/II, DYS448, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438 (penta), DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643 (penta), DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 and Y-GATA-H4. Tomado de PowerPlex® Y23 System. Promega (2018).⁽⁵⁵⁾

4.5) Electroforesis Capilar

En la PCR en la que los alelos STR se amplifican, se produce una mezcla de moléculas de ADN que representa un problema de difícil separación. La PCR multiplex puede producir 20 o más fragmentos de ADN que deben y pueden ser distinguidos uno de otro. Además, la resolución de una sola base requiere que se diferencie entre 13 los alelos estrechamente espaciados (por ejemplo, alelos TH01 9,3 y 10). Con el fin de observar las diversas moléculas una de otra, el paso de separación requiere mover aparte los fragmentos en diferentes tamaños. La separación se realiza típicamente por un proceso conocido como electroforesis y se lleva a cabo ya sea en gel o en capilar. La detección de la muestra se lleva a cabo automáticamente por el instrumento de Electroforesis Capilar (EC) a través de la medición del intervalo de tiempo de inyección de la muestra y cuya detección se realiza a través de una CCD cámara. La luz de un láser incide en el capilar en una posición fija, en donde se ha dejado una ventana en la cubierta del capilar. Los fragmentos de ADN son iluminados a medida que pasan por la ventana en el capilar. Como en los geles, las moléculas más pequeñas llegan primero al punto de detección, seguidas por las moléculas más grandes. Los datos obtenidos de la separación están representados gráficamente en función de la intensidad relativa de fluorescencia observada a partir de la emisión de fluorescencia de los colores que pasan el detector. Las señales de emisión fluorescente de los colorantes que están unidos a las moléculas de ADN se pueden utilizar para detectar y cuantificar las moléculas de ADN que pasan por el equipo, Figura 19.⁽¹⁶⁾

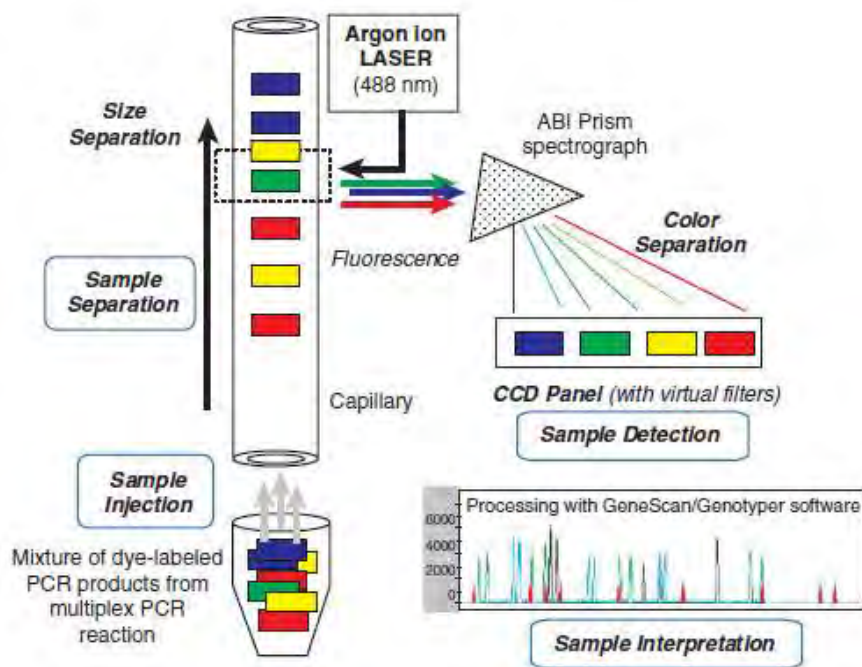


Figura 19. Separación y detección de fragmentos de ADN. Tomado de Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2005). ⁽³⁾

La Electroforesis Capilar es un método de separación de alto rendimiento comúnmente empleado para el análisis de ADN debido a tiempos de análisis rápidos y volúmenes de muestra pequeños. Para lograr una tipificación de STR confiable, se deben cumplir tres condiciones. En primer lugar, se necesita una resolución espacial para separar los alelos STR que pueden diferir en tamaño en un sólo nucleótido. En segundo lugar, se necesita una resolución espectral para separar los colorantes fluorescentes entre sí, de modo que los productos de PCR de los loci marcados con diferentes fluorocromos puedan resolverse. En tercer lugar, la precisión del tamaño del ADN de corrida a corrida, debe ser lo suficientemente constante como para que las muestras se puedan relacionar con los marcadores alélicos que se corren con fines de calibración.⁽⁹⁾

Los elementos principales de un instrumento básico de EC incluyen un capilar de vidrio angosto, dos viales de amortiguador y dos electrodos conectados a una fuente de alimentación de alta tensión. Los sistemas EC también contienen una fuente de excitación láser, un detector de fluorescencia, un muestreador automático para contener los tubos de muestra o la bandeja, y una computadora para controlar la inyección y detección de la muestra. Los capilares están hechos de vidrio y típicamente tienen un diámetro interno de 50 μm (similar al grosor de un

cabello humano). Los analizadores genéticos de ABI generalmente usan capilares con distancias de inyección a detección de 36 cm o 50 cm. Para algunos trabajos de mayor resolución, como la secuenciación de ADN de lectura prolongada, se pueden usar capilares de 80 cm, Figura 20.⁽⁹⁾



Figura 20. ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Tomado de 3100 Genetic Analyzer. Thermo Fisher Scientific (2015).⁽⁵⁶⁾

4.6) Análisis de fragmentos

Los fragmentos de ADN representados por picos en la Electroforesis Capilar, se comparan con un estándar que se mezcla con las muestras de ADN. Este estándar se marca con diferentes colores de fluorocromos que se distinguen espectralmente los fragmentos de tamaño desconocido. Después de la lectura de las muestras junto con el estándar, los datos se analizan por un software, encargado de determinar el genotipo de cada muestra por comparación del tamaño de los alelos observados dentro del marcador alélico para eso obtener los alelos del locus analizado de la muestra problema de ADN.⁽⁵⁷⁾

El objetivo de calibrar los fragmentos de ADN con el estándar interno es saber el valor de la molécula que se está midiendo para así poder asignar una etiqueta. Este proceso se basa en un algoritmo que ayuda a determinar la proporción de los fragmentos de ADN y es conocido como método local. Este método usa el tamaño de dos picos conocidos y en medio uno desconocido, Figura 21.⁽⁵⁷⁾

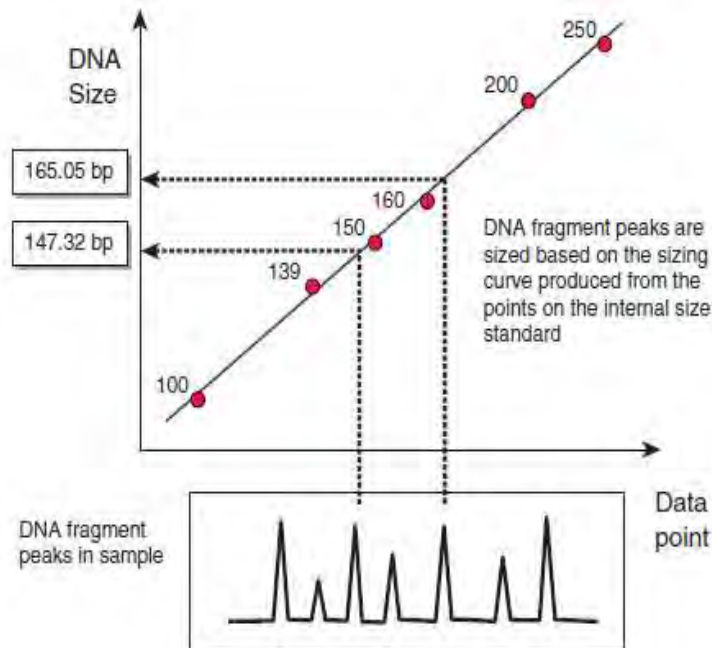


Figura 21. Ejemplo del método local, utilizado en la determinación de longitud de fragmentos. Tomado de Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2005).⁽³⁾

5) Aplicaciones en investigación de la paternidad, criminalística e identificación de personas desaparecidas.

- Pruebas de paternidad

La curiosidad por la forma en que se transmiten la vida y los rasgos familiares ha acompañado siempre al ser humano. Además de la aplicación del análisis del ADN en la identificación humana, su uso se extiende a los estudios de parentesco. Cuando es importante conocer quién es el padre en los delitos de índole sexual para de esta forma detener al responsable, o en la búsqueda de personas desaparecidas e investigaciones de desastres que incluyen análisis reverso de parentesco, así como en los asuntos de inmigración; el análisis del ADN se convierte en una de las herramientas más importantes para resolver estos casos, que antes se consideraban complicados. Gracias a la forma predecible con que el ADN se segrega a la descendencia, es fácil excluir la relación de parentesco entre muestras problema (provenientes de restos óseos, de cualquier otro tejido o fluido de cadáveres o personas sometidas a prueba) y muestras de referencia.⁽¹⁶⁾

- Criminalística

El delito en general, surgió con el hombre mismo, y éste, consciente de la punibilidad de su acción, siempre ha intentado ocultar la autoría. Y desde siempre el delito ha venido acompañado de la necesidad de investigarlo, de aclararlo, de buscar y castigar al culpable. Con el paso del tiempo se ha ido desarrollando la criminalística, que podemos definir como la “ciencia aplicada que de acuerdo al ordenamiento jurídico de cada país, estudia científicamente los indicios y evidencias con objeto de convertirlos en pruebas formales que puedan ser presentadas ante las autoridades judiciales para permitir la identificación de víctimas y de los delincuentes y esclarecer las circunstancias de un probable delito”. El obtener un perfil es sólo la primera parte del análisis, los perfiles tienen que ser comparados. Por ejemplo, si un perfil obtenido de una evidencia recolectada de un lugar de los hechos es comparado con el perfil del probable responsable, se presentan dos posibles situaciones: los perfiles pueden ser los mismos o pueden ser diferentes. Si los perfiles son diferentes, la interpretación es simple: la evidencia recolectada del lugar de los hechos, no pertenece al probable responsable, y se considera como una exclusión. Si los perfiles son los mismos, entonces es una inclusión y significa que la coincidencia debe ser estimada.⁽¹⁶⁾

- Identificación de personas desaparecidas

Los conflictos armados, como la guerra u otras situaciones de violencia armada generalizada, así como también catástrofes naturales suelen traer consigo la desaparición de numerosas personas. Cualquiera que sea el motivo de su desaparición, la falta de noticias de sus seres queridos, sumada a la incertidumbre acerca de su paradero, causan sufrimientos indecibles a los familiares afectados. En estas situaciones, es frecuente que las personas desaparecidas hayan muerto. Por ello la identificación adecuada de los restos humanos es parte fundamental del proceso de reparación no sólo para los familiares de personas desaparecidas, sino para comunidades enteras. La identificación de un cadáver depende básicamente del estado del mismo, si el cuerpo está en condiciones que permitan tomar fotografías, huellas dactilares o datos odontológicos, los datos obtenidos pueden ser de gran ayuda para la identificación. Cuando todas estas posibilidades se agotan, o cuando el cadáver no es sino un esqueleto, surge la necesidad de usar algo más específico, a ser posible único, que esté en todos los cadáveres y que se pueda encontrar incluso en los huesos: ese algo es el ADN.⁽¹⁶⁾

6) Validación interna para laboratorios forenses

La implementación de nuevos procedimientos en laboratorios forenses para obtener resultados que conduzcan a la condena o absolución de un sospechoso debe evaluarse y validarse cuidadosamente. Cuando se discute la importancia de mantener buenas prácticas de laboratorio para obtener resultados científicos precisos, se debe tener en cuenta la garantía de calidad y el control de calidad. La garantía de calidad se refiere a las acciones planificadas o sistemáticas que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio satisfará ciertos requisitos de calidad. El control de calidad se refiere a las técnicas de operación diaria y las actividades utilizadas para cumplir con los requisitos de calidad. Como tal, una organización planifica medidas de garantía de calidad y lleva a cabo actividades de control de calidad en el laboratorio.⁽⁵⁸⁾

El desarrollo constante de nuevas metodologías para las pruebas de ADN conduce a un proceso constante de validación en los laboratorios forenses. Validar un proceso de laboratorio particular es demostrar que es robusto, reproducible y confiable. Existen dos tipos de validación: *i)* la validación del desarrollo que es realizada por el fabricante o un grupo de laboratorios para probar nuevos sistemas, nuevos conjuntos de *primers* y nuevas tecnologías para detectar alelos; *ii)* la validación interna, más específica para las necesidades de un laboratorio forense en particular, consiste en verificar que los procedimientos establecidos previamente evaluados por la validación del desarrollo brindados por otro laboratorio funcionen efectivamente en el laboratorio.⁽⁵⁸⁾

Las directrices de validación en el análisis de ADN han sido publicadas previamente por el Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos de Análisis de ADN (TWGDAM) en 1989, 1991 y 1995, pero en julio de 2003, el Grupo de Trabajo Científico del FBI en Métodos de Análisis de ADN (SWGDAM) publicó pautas de validación revisadas que proporcionan información de validación más detallada.^(59, 60) En diciembre de 2012, SWGDAM realizó revisiones menores a las directrices de validación de 2003 y el proceso de validación interna se modificó para incluir varios estudios (muestras de evidencia conocidas y no probatorias, estudios estocásticos y de sensibilidad, precisión y exactitud, evaluación de contaminación y mezclas).⁽⁵⁸⁾

Los resultados de estos estudios deben compararse con los resultados previos de muestras conocidas o muestras de casos simulados para garantizar la concordancia. La sensibilidad se

usa para determinar la cantidad mínima de ADN genómico necesaria para obtener un resultados confiable, y suele realizarse examinando una serie de diluciones de muestras con genotipos conocidos, este estudio estiman la cantidad objetivo ideal. Los resultados de sensibilidad también se usan para evaluar los estudios estocásticos, determinando la relación señal/ruido asociada con el ensayo, como el del umbral analítico y estocástico. Además del cálculo del porcentaje *stutter* y el límite de linealidad.⁽⁵⁸⁾

La precisión, caracteriza el grado de conformidad entre una serie de mediciones individuales. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o el valor especificado. La medida de precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba. En esta prueba se miden los tamaños de pares de bases calculados para los productos de amplificación del alelo STR. Todos los alelos medidos deben caer dentro de una ventana de ± 0.5 pb alrededor del tamaño medido para el alelo correspondiente en la escalera alélica.^(58, 61)

La exactitud, es el grado de conformidad de una cantidad medida con su valor real. La precisión de un instrumento de medición es la capacidad de un instrumento de medición para dar respuestas cercanas a un valor real y se evalúa con dos pruebas, la de reproducibilidad que se utilizan para evaluar la variación obtenida por diferentes operadores que usan el mismo equipo de medición para medir repetidamente la misma muestra. La prueba de repetibilidad se utiliza para evaluar la variación de las medidas obtenidas por un sólo operador, utilizando el mismo equipo y método de medición, para analizar repetidamente la misma muestra. La evaluación de la contaminación se lleva a cabo utilizando controles negativos y muestras conocidas para detectar ADN exógeno que puede originarse a partir de reactivos, materiales, operador y/o laboratorio.^(58, 61)

Finalmente, los estudios de mezclas se llevan a cabo para ayudar a los laboratorios forenses a establecer pautas para la interpretación de muestras de ADN mixtas, que son las que generalmente se encuentran en las escenas del crimen. Estas pautas incluyen la determinación del número de contribuyentes a una mezcla biológica, la determinación de los perfiles mayor y menor de contribuyentes y las proporciones de los contribuyentes. Los resultados de las pruebas de mezcla también se pueden usar para evaluar la contaminación de los laboratorios.⁽⁵⁸⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que si a diferentes expertos en Genética Forense se les da a trabajar un caso con las mismas evidencias, se tendrán diferentes resultados e interpretaciones del mismo caso.⁽⁶²⁾ Las discrepancias entre los expertos, trae como consecuencia la duda razonable en el juzgador, que deriva en la exoneración del probable responsable. Esta resolución, evidentemente trae consigo, consecuencias que impactan negativamente a nuestra sociedad, en virtud de que en múltiples ocasiones tendríamos a delincuentes libres y dispuestos a seguir cometiendo delitos y a una sociedad en permanente riesgo.

La razón de las discrepancias entre los expertos en los resultados e interpretaciones, se debe a la falta de pericia de algunos expertos, a que se aplican procedimientos técnicos científicos no verificados en el laboratorio, al poco control de la evidencia documental de los análisis que se realizan, y al desconocimiento del valor de los parámetros analíticos críticos para la correcta interpretación de la evidencia genética, incluidos en el sistema de gestión y control de calidad.

La implementación de nuevas tecnologías y metodologías para las pruebas de ADN en laboratorios forenses para obtener resultados que conducen a la resolución de un caso deben evaluarse y validarse cuidadosamente. Cuando se discute la importancia de mantener buenas prácticas de laboratorio para obtener resultados científicos exactos y precisos, se debe tener en cuenta la garantía de calidad y el control de calidad. Conduciendo a un proceso constante de validación en los laboratorios forenses. Validar un proceso de laboratorio particular es demostrar que es robusto, reproducible y a través de un intervalo de condiciones. La validación de los métodos es un requisito indispensable para la acreditación de un laboratorio bajo la norma ISO/IEC 17025:2017.

Al contar con la acreditación se tiene certeza de que el laboratorio aplica con precisión las regulaciones, normas o estándares correspondientes que le permite comprobar y sustentar los resultados obtenidos, permitiendo así ofrecer garantías de calidad en el análisis de los resultados aplicables a diferentes contextos. Tal es así que la acreditación ha pasado a ser una exigencia legal, evidenciando la importancia de la mejora continua y la permanente búsqueda de la calidad en los resultados.

OBJETIVOS GENERALES

- Validar y verificar los procedimientos utilizados para el análisis de ADN en el laboratorio de Genética Forense.
- Establecer los parámetros y criterios de los procedimientos validados para evaluar los resultados de muestras de referencia e indicios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar protocolos de validación y verificación de métodos no normalizados.
- Verificar las pruebas de orientación para la identificación de sangre, semen y saliva: ABACard Hematrace®, ABACard® p30 y SALIgAE®.
- Validar los métodos de extracción con los sistemas Tissue and Hair Extraction Kit y Bone Incubation®.
- Validar el método de preparación de hueso.
- Validar el método de purificación con el sistema DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.
- Validar el uso del papel FTA® para muestras de referencia con los sistemas de amplificación PowerPlex® Fusion y PowerPlex® Y23.
- Validar el método de lavado para muestras de sangre en FTA® card.
- Validar el método de cuantificación con el sistema Plexor® HY.
- Validar el método de amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion.
- Validar el método de amplificación con el sistema PowerPlex® Y23.
- Realizar la validación de los equipos: Maxwell® 16, Biomek® 3000 y Stratagene MX3000P® mediante el sistema PowerPlex® Fusion.

HIPÓTESIS

Una vez conocidos y validados los procedimientos utilizados para el análisis de ADN se establecerían los parámetros y criterios para evaluar los resultados obtenidos de muestras de referencia e indicios remitidos al laboratorio sobre una base de calidad, esperando los siguientes valores para muestras de referencia: altura promedio por arriba de 300 y por debajo de 5000 RFUs y porcentaje de recuperación del perfil del 100%. Y los siguientes valores para indicios: cantidad óptima de ADN entre 0.1 y 0.5 ng, umbral analítico entre 25 y 50 RFUs, umbral estocástico entre 150 y 300 RFUs y porcentajes *stutter* no mayor al 15%.

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio Observacional, Prolectivo, Transversal y Descriptivo.

UNIVERSO DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en pruebas de orientación, sistemas y procedimientos de extracción, purificación, cuantificación y amplificación y equipos utilizados para el análisis de ADN con muestras obtenidas de 43 individuos de manera aleatoria y 34 huesos de casos trabajados en el laboratorio de Genética Forense LORGEN MÉXICO S.A. de C.V., ubicado en Av. Municipio Libre 366, Santa Cruz Atoyac, 03310 Benito Juárez, CDMX.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

INCLUSIÓN

Se incluyeron en la validación interna, pruebas de orientación, sistemas y procedimientos de extracción, purificación, cuantificación y amplificación y equipos utilizados en el análisis de ADN para muestras de referencia e indicios en el laboratorio de Genética Forense LORGEN MÉXICO S.A. de C.V.

EXCLUSIÓN

Se excluirían de la validación los sistemas de extracción, purificación, cuantificación, amplificación o caducados y equipos fuera de servicio en el laboratorio de Genética Forense LORGEN MÉXICO S.A. de C.V.

ELIMINACIÓN

Se eliminarían de la validación los sistemas de extracción, purificación, amplificación y cuantificación que ya no fueran distribuidos más por la casa comercial o sustituidos por un nuevo sistema y equipos que sufrieran de averías y deberían ser sometidos a mantenimiento.

VARIABLES

INDEPENDIENTES

- Tratamiento previo de las muestras
- Condiciones de extracción y purificación
- Volumen de mezcla de reacción para amplificación para muestras de sangre en papel FTA
- Perfil térmico de amplificación y cuantificación
- Condiciones de electroforesis

DEPENDIENTES

- Reproducibilidad
- Concentración de ADN
- Porcentaje de recuperación de alelos
- Porcentaje de recuperación del perfil
- Altura promedio de alelos
- Rendimiento de ADN
- Contaminación
- Sensibilidad
- Cantidad óptima de ADN
- Límite de linealidad
- Límite de detección
- Umbral analítico
- Umbral estocástico
- Porcentaje *stutter*
- Especificidad
- Precisión
- Repetibilidad

MATERIAL Y MÉTODO

Materiales

- Torundas
- Ligadura
- Tubos con EDTA
- Agujas
- Cubrebocas
- Jeringas de 5 mL
- Lancetas
- Encendedor
- Frasco estéril
- Harris Micro-Punch
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL y 2 mL
- Hisopos
- Bulbos de plástico
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL
- Hojas para bisturí
- Portaobjetos
- Sobres
- Papel FTA® (Nº Z719730 Sigma-Aldrich)
- Placas para cuantificación
- Tapas ópticas Agilent
- Micropipeta Eppendorf de 10 µL, 100 µL y 1000 µL
- Puntas para pipeta de 10 µL, 100 µL y 1000 µL
- Guantes de nitrilo
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos de 0.25 mL
- Placas de 96 pozos para cuantificación y electroforesis
- Tapas de goma para placa de 96 pozos
- Tapas para charola de amplificación
- Timer

Reactivos

- ABACard® p30 (Cat. 404334 Abacus Diagnostics)
- ABACard® HemaTrace® (Cat. 808426 Abacus Diagnostics)
- SALIgAE® (Cat. 903295 Abacus Diagnostics)
- DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 (Cat. AS1240 Promega)
- PowerPlex Fusion® System (Cat. DC2402 Promega)
- Plexor® HY System (Cat. DC1001 Promega)
- InnoTyper® 21 (Cat. 21109-100 Innogenomics)
- PowerPlex® Y23 System (Cat. DC2305 Promega)
- Dithiothreitol (Cat.V3151 Promega)
- Agua inyectable
- Solución salina
- Etanol al 70%
- FTA Reagent
- Proteínasa K (Cat.V3021 Promega)
- Tissue and Hair Extraction Kit (Cat. DC6740 Promega)
- Bone Incubation® Buffer
- Formamida
- POP-4
- Amortiguador TE⁻⁴

Muestras biológicas

- Semen
- Sangre líquida
- Sangre en papel FTA
- Saliva
- Saliva en hisopo
- Pelo
- Hueso

Equipo

- Stratagene MX3005P®
- Termociclador GENEAMP® SYSTEM 9700
- Maxwell® 16
- Biomek® 3000
- Secuenciador ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer
- Campana de Bioseguridad Air Clean® 600 PCR Workstation
- Centrífuga
- Congelador Revco
- Refrigerador Revco
- Vortex
- Thermomixer

TÉCNICAS

Obtención de las muestras

Se solicitó al donante firmar un formato de consentimiento informado de la donación de la muestra como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico, explicando previamente el alcance del estudio (ver formato de consentimiento informado en Anexo B):

- Semen: La muestra de semen fue recolectada en un frasco estéril que le proporcionó el laboratorio al donante, rotulado previamente por él mismo. El semen se obtuvo por masturbación, tras orinar y lavar cuidadosamente las manos y genitales.
- Sangre venosa: Se pidió al donante sentarse cómodamente, posteriormente se ubicó la vena a puncionar en el antebrazo, se realizó asepsia en el área con una torunda con alcohol al 70% y se colocó una ligadura. La punción se realizó con una jeringa de 5 mL, después de alcanzar el volumen deseado se retiró la ligadura y posteriormente la jeringa. La sangre se depositó en un tubo con EDTA previamente rotulado y se homogenizó la muestra.
- Sangre en papel FTA: Se tomó sangre capilar mediante la punción del dedo y se colocó en papel FTA, se dejó secar y se embolsó en su sobre correspondiente, cada donante etiquetó su papel FTA.
- Saliva: Se rotuló un tubo Eppendorf de 2 mL y se solicitó al donador depositar saliva en el tubo hasta completar una cuarta parte, aproximadamente a 500 µL. Se cerró el tubo perfectamente y se homogenizó la muestra.
- Saliva en hisopo: Se realizó un raspado de los carrillos internos del donador con ayuda de un hisopo, el hisopo se dejó secar durante 24 horas.
- Pelo: Se arrancaron 2 pelos de la parte frontal de la cabeza con unas pinzas metálicas y se colocaron en un sobre blanco.
- Hueso: Las muestras que se utilizaron fueron restos óseos de casos trabajados en el laboratorio.

I. Verificación de las pruebas de orientación

ABAcard® p30

Control de calidad: Los controles se realizaron en conjunto con las muestras para analizar. El control positivo consistió en una dilución 1:500 de una muestra de semen y el control negativo en agua inyectable.

Sensibilidad: El estudio se realizó utilizando tres muestras de semen fresco. Se prepararon las siguientes diluciones de las muestras con agua inyectable: 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:8000, 1:10000, 1:100000 y 1:500000.

Especificidad: Se utilizaron dos muestras de sangre y dos de saliva, de las cuales se prepararon diluciones 1:500 con agua inyectable.

Preparación de la prueba: Se removieron las placas del sobre sellado y se rotularon. Se adicionaron 200 µL de una muestra sin diluir, los controles y las diluciones preparadas.

Interpretación: Después de 10 min, se registró el resultado. Un resultado positivo se indicó mediante dos líneas rosas en las posiciones de control (C) y de prueba (T) en la placa de la prueba. Un resultado débil positivo se indicó mediante una línea rosa parcialmente desarrollada en la posición de prueba (T) o en la posición de control (C) en la placa de prueba. Se indicó un resultado negativo mediante una línea rosa en la posición de control (C) en la placa de prueba.

ABAcard® HemaTrace®

Control de calidad: Los controles se realizaron en conjunto con las muestras para analizar. El control positivo consistió en una dilución 1:500 de una muestra de sangre y el control negativo únicamente en buffer de extracción ABAcard® HemaTrace®.

Sensibilidad: El estudio de sensibilidad se evaluó con tres muestras de sangre. Se prepararon las siguientes diluciones de las muestras con buffer de extracción ABAcard® HemaTrace®: 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:500000.

Especificidad: Se utilizaron dos muestras de semen y de saliva, de las cuales se prepararon diluciones 1:500 con buffer de extracción ABAcard® HemaTrace®.

Preparación de la prueba: Se removieron las placas del sobre sellado y se rotularon. Se adicionaron 200 µL de una muestra sin diluir, los controles y las diluciones preparadas.

Interpretación: Después de 10 min, se registró el resultado. Un resultado positivo se indicó mediante dos líneas rosas en las posiciones de control (C) y de prueba (T) en la placa de la

prueba. Un resultado débil positivo se indicó mediante una línea rosa parcialmente desarrollada en la posición de prueba (T) o en la posición de control (C) en la placa de prueba. Se indicó un resultado negativo mediante una línea rosa en la posición de control (C) en la placa de prueba.

SALIgAE®

Control de calidad: Los controles se realizaron en conjunto con las muestras para analizar. El control positivo consistió en una muestra de saliva sin diluir y el control negativo en agua inyectable.

Sensibilidad: El estudio de sensibilidad se evaluó con tres muestras de saliva. Se prepararon las siguientes diluciones de las muestras con agua inyectable: 1:10, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:20000.

Especificidad: En el estudio de especificidad se utilizaron dos muestras de semen, de las cuales se prepararon diluciones 1:500 con agua inyectable

Preparación de la prueba: Para realizar la prueba se colocaron 50 µL del buffer SALIgAE® en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se rotularon. Se adicionaron 8 µL de los controles y las diluciones preparadas.

Interpretación: Los resultados se registraron al cabo de 10 minutos. Un cambio de color amarillo fue un resultado positivo, un resultado débil positivo menos intensidad en el color amarillo y difícil de interpretar cuando más de una analista observa un resultado diferente, mientras que la falta de un cambio de color amarillo visible indicó un resultado negativo. Todos los resultados experimentales se interpretaron en el marco de controles positivos y negativos válidos

II. Validación del método de extracción con los sistemas sistema Tissue and Hair Extraction Kit y DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16

Reproducibilidad de muestras conocidas y no probatorias: Se utilizaron muestras de sangre, saliva, semen y pelo de individuos diferentes, se extrajeron 2 veces cada tipo de muestra. La extracción se realizó mediante el uso de Tissue and Hair Extraction Kit. Para las muestras de sangre y semen se colocaron 100 µL de sangre total o semen en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 600 µL de buffer de digestión, el cual se preparó con las siguientes proporciones: por cada mililitro 800 µL de amortiguador de incubación, 100 µL de DTT y 100 µL de proteinasa K. Las muestras de pelo se colocaron en una laminilla con cinta scotch y se observaron con un microscopio estereoscópico. Se cortó 0.5 cm de la raíz del pelo con una hoja de bisturí y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 µL. Se lavaron dos veces con 500 µL de agua inyectable, desechando el agua entre cada lavado. Se le añadieron 700 µL de buffer de digestión y por último en el caso de la muestra de exudado oral, se colocó toda la cabeza de algodón en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 700 µL de buffer de digestión.

Todas las muestras se colocaron a incubación en un baño seco a 56 grados Celsius por una hora. Se tomaron 200 µL del digerido y se colocaron en un cartucho de muestra previamente etiquetado. Se colocaron 100 µL de buffer de elución en cada tubo del kit y se procedió a realizar la purificación en el equipo Maxwell® 16.

Los genómicos obtenidos se cuantificaron con Plexor® HY System, se normalizaron con el Biomek® 3000 y se amplificaron con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se determinó el perfil utilizando los parámetros de análisis del laboratorio y verificar que se obtuvo el perfil correcto.

Contaminación cruzada: Se prepararon blancos de extracción, para esto se adicionaron 700 µL de buffer de digestión preparado, de la misma manera que la prueba de reproducibilidad, en 8 tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se colocaron a incubación en un baño seco a 56 grados Celsius por una hora. Se tomaron 200 µL de cada digerido y se colocaron en un cartucho de muestras, los blancos se colocaron de manera alternada con las muestras de reproducibilidad dentro del equipo Maxwell® 16 y se procedió a realizar la purificación, usando el mismo volumen de elución. Se repitió dos veces más para un total de tres repeticiones para demostrar consistencia en la prueba.

Se cuantificaron los ADN genómicos con Plexor® HY System y se amplificaron con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se analizarán los electroferogramas observando que no se obtuviera ADN en los blancos preparados.

Rendimiento de ADN: Se utilizaron muestras de sangre y semen, se realizaron 3 diluciones para cada tipo de muestra: 1:50, 1:500 y 1:5000 en solución salina. Se colocaron 50 µL de las diluciones en 3 hisopos para cada dilución. Se dejaron secar los hisopos con la muestra por 24 horas. La extracción se realizó mediante el uso de Tissue and Hair Extraction Kit. Una vez secos los hisopos, se colocó toda la cabeza de algodón en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 300 µL de buffer de digestión a cada tubo, el cual se preparó con las siguientes proporciones: por cada mililitro 800 µL de amortiguador de incubación, 100 µL de DTT y 100 µL de proteinasa K. Se colocaron a incubación en un baño seco a 56 grados Celsius por una hora. Después de la digestión el hisopo se colocó en un spin basket y se centrifugó 5 minutos a 12800 rpm. Se tomaron 200 µL del digerido y se colocaron en un cartucho de muestra previamente etiquetado. Se colocarán 50 µL de buffer de elución en cada tubo del kit y se procedió a realizar la purificación en el equipo Maxwell® 16. Posteriormente el genómico se cuantificó con Plexor® HY System.⁽⁶³⁾

III. Validación del método de extracción con el protocolo Bone Incubation® Buffer y el tratamiento de muestras de hueso

Se utilizaron 34 muestras de huesos. Se cortó un fragmento de la muestra ósea y se depositó en un tubo Falcon de 50 mL previamente etiquetado. Se agregó EDTA (0.5M pH=8) grado molecular hasta cubrir el hueso perfectamente. Se incubó en un baño seco durante 48 horas a 37 grados Celsius con 3 cambios de EDTA. Se realizaron cortes transversales de la muestra para obtener pequeños y delgados laminados del mismo, usando una hoja de bisturí. El laminado se depositó en un tubo de 2 mL, etiquetado previamente. Se adicionó agua inyectable hasta cubrir el laminado y se agitó en vortex durante cinco a diez segundos, se realizaron diez lavados o en algunos casos hasta que el agua era totalmente transparente. Se agregó la cantidad necesaria de mezcla de incubación para cubrir el laminado, que contenía por cada mililitro: 800 µL de Bone Incubation® Buffer, 100 µL de proteinasa K y 100 µL de DTT.

Se colocaron a incubación en un baño seco a 56 grados Celsius por una hora. Se tomaron 200 μ L del digerido y se colocaron en un cartucho de muestra previamente etiquetado. Se colocaron 50 μ L de buffer de elución en cada tubo del kit. Se procedió a realizar la purificación en el equipo Maxwell[®] 16. Posteriormente, el genómico se cuantificó con Plexor[®] HY System, se normalizaron con el Biomek[®] 3000 y se amplificaron con PowerPlex[®] Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.

IV. Validación del uso de papel FTA[®] para muestras de referencia y lavado del papel

Se utilizaron muestras de sangre capilar de 10 individuos masculinos en papel FTA. En una bitácora se colocó el nombre de la muestra en la posición correspondiente en una placa de 96 pozos. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción de PowerPlex[®] Fusion System con las cantidades indicadas en la Tabla 1, de tal manera que cada muestra se amplificó con 15 μ L de mezcla de reacción.

Tabla 1. Mezcla de PCR para amplificación directa de ADN en un volumen de reacción de 15 μ L para PowerPlex[®] Fusion System.

Reactivo	Volumen (μ L)
Agua grado amplificación	9.0
PowerPlex [®] Fusion 5X Master Mix	3.0
PowerPlex [®] Fusion 5X Primer Pair Mix	3.0

Se preparó la mezcla de reacción considerando el total de muestras, el control negativo y 2 reacciones adicionales por el error de pipeteo. Se colocaron 15 μ L de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa. Se colocó un disco de 1.2 mm de papel FTA, tomado con un Harris Micro-Punch, en cada pozo correspondiente, esto se realizó por duplicado. Al final se amplificaron 20 muestras y un control negativo. Las muestras se amplificaron a 26 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.

Se colocaron 6 fragmentos de cada una de las muestras en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, previamente etiquetado con el número de muestra correspondiente. Se agregaron 400 µL de FTA Reagent a cada tubo, se centrifugaron a 1000 rpm durante cinco minutos, después de la centrifugación se decantó el líquido. Se agregaron 400 µL de agua inyectable y se centrifugó a las mismas condiciones, se decantó el líquido, y finalmente se agregaron 400 µL de agua inyectable, se centrifugó y se eliminó el agua con ayuda de una micropipeta. Se dejaron abiertos los tubos dentro de la campana para dejar secar durante una hora.

Para PowerPlex® Y23 se preparó la mezcla con las cantidades indicadas en la Tabla 2, de tal manera que cada muestra se amplificó con 15 µL de mezcla de reacción.

Tabla 2. Mezcla de PCR para amplificación directa de ADN en un volumen de reacción de 15 µL para PowerPlex® Y23.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua grado amplificación	13.5
PowerPlex® Y23 5X Master Mix	3.0
PowerPlex® Y23 5X Primer Pair Mix	1.2

Se preparó la mezcla de reacción considerando el total de muestras, el control negativo, el control positivo y 2 reacciones adicionales por el error de pipeteo. Se colocaron 15 µL de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa. Se colocó un disco de 1.2 mm de papel FTA previamente lavado en el pozo correspondiente, esto se realizó por duplicado. Al final se amplificaron 20 muestras, un control negativo y un control positivo. Las muestras se amplificaron a 26 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos para PowerPlex® Fusion System y PowerPlex® Y23 System. Se calculó el porcentaje de recuperación del perfil de todas las muestras.

V. Validación del método de cuantificación con el sistema Plexor® HY System y los equipos Biomek® 300 y Stratagene MX3005P®

Reproducibilidad: Se realizaron diluciones de ADN estándar masculino Plexor® HY System partiendo de 50 ng/μL a 10 ng/μL, 0.40 ng/μL y 0.016 ng/μL usando el equipo Biomek® 3000. Se cuantificaron cinco veces cada una de las concentraciones con el equipo Stratagene MX3005P®, en una sola placa y posteriormente en dos placas adicionales. Se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores de cuantificación autosómica y Y para cada concentración de ADN para evaluar la reproducibilidad dentro de una placa y entre placas.

Sensibilidad: Se utilizaron muestras de sangre de dos masculinos. Se colocaron 150 μL de sangre total en tubos Eppendorf de cada muestra. La extracción se realizó mediante el uso de Tissue and Hair Extraction Kit. Se adicionaron 150 μL de buffer de digestión, el cual se preparó con las siguientes proporciones: por cada mililitro 800 μL de amortiguador de incubación, 100 μL de DTT y 100 μL de proteinasa K. Se colocaron a incubación en un baño seco de 56 grados Celsius, por al menos, una hora. Se tomaron 200 μL de cada extracto y se colocaron en un cartucho de muestras previamente etiquetados. Se colocaron 150 μL de buffer de elución en cada tubo del kit y se procedió a realizar la purificación en Maxwell® 16. Se cuantificaron los genómicos obtenido con Plexor® HY System.

A partir del dato de cuantificación se obtuvieron las siguientes concentraciones de los 2 genómicos masculinos: 0.060 ng/μL, 0.020 ng/μL, 0.0067 ng/μL, 0.0022 ng/μL y 0.00070 ng/μL. Se cuantificaron con Plexor® HY System y se amplificaron las cinco concentraciones por duplicado con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A), agregando 2 μL de cada concentración por reacción. Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kv y tiempo de inyección de 5 segundos. Se analizaron las muestras amplificadas y se determinó la cantidad de ADN en la que ya no se generaron resultados.⁽⁶⁴⁾

VI. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion.

Sensibilidad: Se utilizaron muestras de sangre de dos masculinos. Se colocaron 150 µL de sangre total en tubos Eppendorf de cada muestra. Se agregó un mL de agua inyectable y se lisaron los eritrocitos, se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos, y se repitió una vez más, desechando el sobrenadante. La extracción se realizó mediante el uso de Tissue and Hair Extraction Kit. Se adicionaron 150 µL de buffer de digestión, el cual se preparó con las siguientes proporciones: por cada mililitro 800 µL de amortiguador de incubación, 100 µL de DTT y 100 µL de proteinasa K. Se colocaron a incubación en un baño seco de 56 grados Celsius por los menos una hora. Se tomaron 150 µL de cada extracto y se colocaron en un cartucho de muestras previamente etiquetados. Se colocaron 150 µL de buffer de elución en cada tubo del kit y se procedió a realizar la purificación en Maxwell® 16. Se cuantificaron los genómicos obtenidos con el kit Plexor® HY System.

A partir de los datos de cuantificación, se amplificaron las siguientes cantidades de ADN de las muestras: 0.5 ng/µL, 0.25 ng/µL, 0.125 ng/µL, 0.0625 ng/µL, 0.03125 ng/µL y 0.0156 ng/µL con Buffer TE⁻⁴ agregando 2 µL de cada concentración por triplicado con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se analizaron las muestras amplificadas y se determinó la cantidad de ADN en la que ya no se generaron resultados de STR. Se estableció un valor de "corte" de cuantificación por debajo del cual no se espera que la amplificación genere información genética útil.

Umbral analítico: Para determinar el umbral analítico se seleccionaron los perfiles de la prueba de sensibilidad que contenían un pull-up mínimo y que estaban dentro del rango lineal del instrumento de Electroforesis Capilar. Se examinó la línea base de los picos de "ruido" que no eran parte del perfil, *stutters* y artefactos desconocidos del sistema. Para obtener valores de altura máxima para estos picos de "ruido" de bajo nivel, se aseguró de que el umbral de lectura del sistema de software analítico era suficientemente bajo, como 1RFU. Una vez que se identifican los picos de "ruido", se calculó la altura media del pico y la desviación estándar. Se utilizó la altura media del pico más 10 desviaciones estándar como el umbral analítico, indicando el 100% de nivel de confianza.

Umbral estocástico: Para definir el umbral estocástico se utilizaron los datos de los estudios de sensibilidad. Para esto se examinaron los loci heterocigotos donde un alelo hermano cayó por debajo del umbral analítico previamente establecido. Se calculó la altura media del pico y la desviación estándar de los homocigotos falsos observados. El umbral estocástico fue la altura media del pico más tres desviaciones estándar.

Precisión y exactitud: Se utilizó 10 veces la escalera alélica (Allelic Ladder) del sistema y se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se calculó el tamaño promedio de pares de bases y la desviación estándar para cada alelo en el estándar de tamaño interno, tres veces la desviación estándar para cada alelo debe ser inferior a 0.5 pb.

Para demostrar la repetibilidad del sistema, se usó el control positivo del kit, éste fue amplificado con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A) por un operador y se sometió a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.

Para demostrar la reproducibilidad el control positivo fue amplificado con PowerPlex® Fusion System a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A) por un operador diferente y se sometió a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.

Contaminación: Se usaron mezclas de amplificación como blancos que se colocaron durante la validación de este sistema y se sometieron a Electroforesis Capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.⁽⁶⁵⁾

VII. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Y23

Sensibilidad: Se utilizaron muestras de sangre de tres masculinos. Se colocaron 150 µL de sangre total en tubos Eppendorf de cada muestra. Se agregó un mL de agua inyectable y se lisaron los eritrocitos, se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos, y se repitió una vez más, desechando el sobrenadante. La extracción se realizó mediante el uso del kit Tissue and Hair Extraction Kit. Se adicionaron 150 µL de buffer de digestión, el cual se preparó con las siguientes proporciones: por cada mililitro 800 µL de amortiguador de incubación, 100 µL de DTT y 100 µL de proteinasa K. Se colocaron a incubación en un baño seco a 56 grados Celsius durante una hora. Se tomaron 150 µL de cada extracto y se colocaron en un cartucho de muestras previamente etiquetados. Se colocarán 150 µL de buffer de elusión en cada tubo del kit y se procedió a realizar la purificación en Maxwell® 16.

Se cuantificó el genómico obtenido con el kit Plexor® HY. A partir de los resultados de cuantificación, se obtuvieron las siguientes concentraciones utilizando Buffer TE-4: 0.5 ng/µL, 0.25 ng/µL, 0.125 ng/µL, 0.0625 ng/µL, 0.03125 ng/µL y 0.0156 ng/µL y se amplificaron por triplicado agregando 2 µL con el sistema PowerPlex® Y23 a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A). Los amplicones se sometieron a electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se analizaron las muestras amplificadas y se determinó la cantidad de ADN en la que ya no se generaron resultados de STR-Y. Se establecerá un valor de "corte" de cuantificación por debajo del cual no se espera que la amplificación genere información genética útil.

Umbral analítico: Para determinar el umbral analítico se seleccionaron los perfiles de la prueba de sensibilidad que contenían un pull-up mínimo y que estaban dentro del rango lineal del instrumento de Electroforesis Capilar. Se examinó la línea base de los picos de "ruido" que no eran parte del perfil, *stutters* y artefactos desconocidos del sistema. Para obtener valores de altura máxima para estos picos de "ruido" de bajo nivel, se aseguró de que el umbral de lectura del sistema de software analítico era suficientemente bajo, como 1RFU. Una vez que se identifican los picos de "ruido", se calculó la altura media del pico y la desviación estándar. Se utilizó la altura media del pico más 10 desviaciones estándar como el umbral analítico, indicando el 100% de nivel de confianza.

Precisión y exactitud: Se utilizó 10 veces la escalera alélica (Allelic Ladder) del sistema y se sometieron a electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos. Se calculó el tamaño promedio de pares de bases y la desviación estándar para cada alelo en el Allelic Ladder, tres veces la desviación estándar para cada alelo debe ser inferior a 0.5 pb.

Para demostrar la reproducibilidad el control positivo del sistema fue amplificado con el sistema PowerPlex® Y23 a 30 ciclos (ver protocolo de amplificación en Anexo A), sometiéndose a las mismas condiciones de electroforesis.

Contaminación: Se usaron mezclas de amplificación como blancos que se colocaron durante la validación de este sistema y se sometieron a electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con las siguientes condiciones de corrida: voltaje de inyección 3kV y tiempo de inyección 5 segundos.⁽⁶⁶⁾

DISEÑO ESTADÍSTICO

- Obtener los promedios de alturas de alelos y el tamaño de alelos de la escalera alélica de los sistemas de amplificación con la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

- Cálculo de desviación estándar de los tamaños de alelos de la escalera alélica para la evaluación de precisión, concentraciones de ADN autosómico y Y de los valores de cuantificación:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Cálculo de coeficiente de variación de concentraciones de ADN autosómico y Y de los valores de cuantificación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100$$

- Cálculo del límite de detección de los sistemas de amplificación: colocar 1RFU para la lectura y usar todos los picos observados por cada canal, utilizando la fórmula:

$$\text{Límite de detección} = \bar{x} + 3DE$$

- Cálculo del umbral analítico de los sistemas de amplificación: colocar 1RFU para la lectura y usar todos los picos observados por cada canal, utilizando la fórmula:

$$\text{Umbral analítico} = \bar{x} + 10DE$$

- Cálculo del umbral estocástico de los sistemas de amplificación: calcular el promedio de los picos heterocigóticos donde un alelo ha caído por debajo del umbral analítico, utilizando la fórmula:

$$\text{Umbral estocástico} = \bar{x} + 3DE$$

- Cálculo del porcentaje *stutter* de los sistemas de amplificación: dividir la altura del pico *stutter* por la altura del pico del alélico y, posteriormente, multiplicarlo por 100.

$$\text{Porcentaje } stutter = \left(\frac{\text{Altura pico } stutter}{\text{Altura del pico alélico}} \right) 100$$

RESULTADOS

I. Verificación de las pruebas de orientación

ABAcad® p30

Se muestran los controles de calidad de la prueba ABAcad® p30 para evaluar la sensibilidad y especificidad de la misma (Figura 1a y b). Observando resultados negativos en muestras sin diluir (Figura 1c).

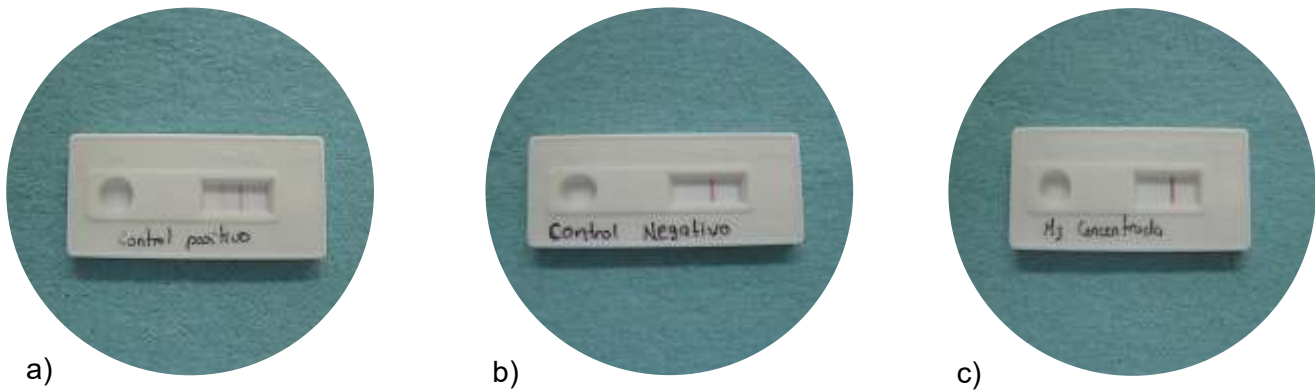


Figura 1. Controles de calidad de la prueba ABAcad® p30: a) Control positivo b) Control negativo c) Muestra concentrada negativa.

En el Gráfico 1 se observan las diferentes diluciones realizadas para evaluar la sensibilidad, las diluciones que presentaron un resultado positivo en las tres muestras fueron: 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:8000 para las tres muestras, estableciendo el corte en la dilución 1:800.

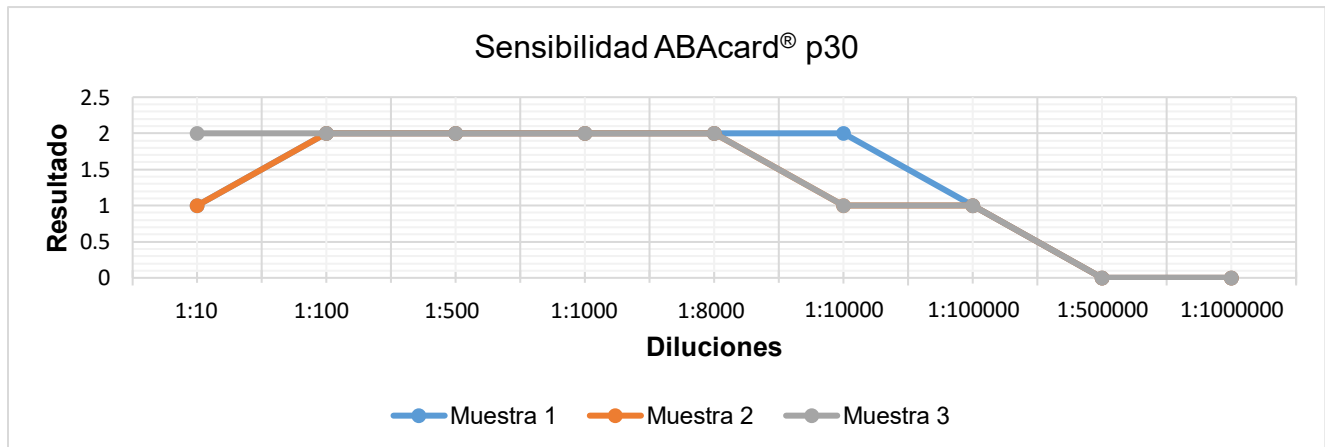


Gráfico 1. Sensibilidad de las muestras de semen fresco diluido. Un positivo débil se basa en el desvanecimiento del color rojo visualizado en la posición de prueba (T) en la placa de prueba en comparación con el color rojo de la posición de control (C). Cuanto menos aparente sea el color rojo, más débil fue considerado el resultado y registrado como tal. Positivo = 2, débilmente positivo = 1 y negativo = 0.

En el estudio de especificidad se obtuvieron resultados negativos para la presencia de antígeno prostático en las muestras de saliva y sangre evaluadas (Tabla 1).

Tabla 1. Especificidad ABACard® p30

Descripción de la muestra	Resultado
Muestra 1 Saliva 1:500	Negativo
Muestra 2 Saliva 1:500	Negativo
Muestra 1 Sangre 1:500	Negativo
Muestra 2 Sangre 1:500	Negativo

ABACard® Hematrace

Se muestran los controles de calidad de la prueba ABACard® HemaTrace® para evaluar la sensibilidad y especificidad de la misma (Figura 2a y 2b). Se puede observar que la muestra concentrada no presentó ningún resultado (Figura 2c).

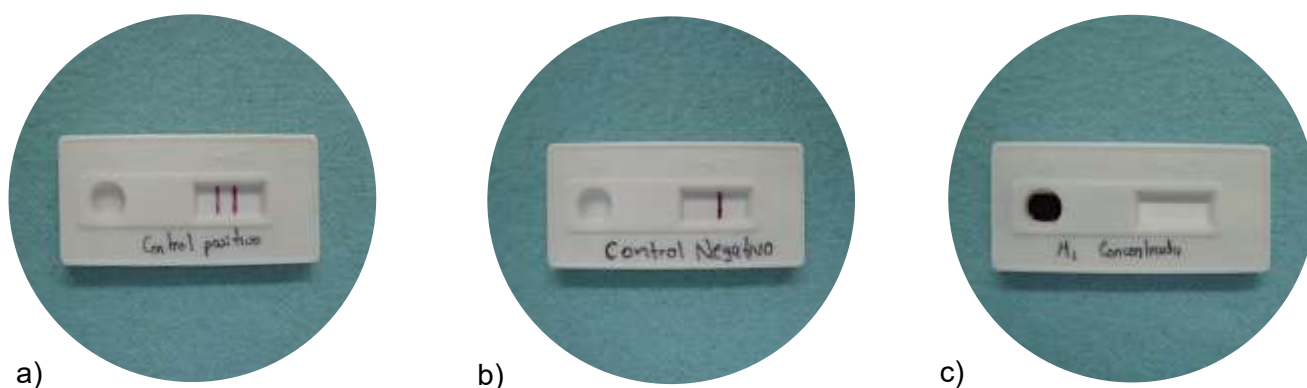


Figura 2. Controles de calidad de la prueba ABACard® Hematrace: a) Control positivo b) Control negativo c) Muestra concentrada sin corrimiento.

En el Gráfico 2 se observan las diferentes diluciones realizadas para evaluar la sensibilidad, las diluciones que presentaron un resultado positivo fueron 1:100, 1:500 y 1:1000 para las tres muestras, estableciendo el corte en la dilución 1:1000.

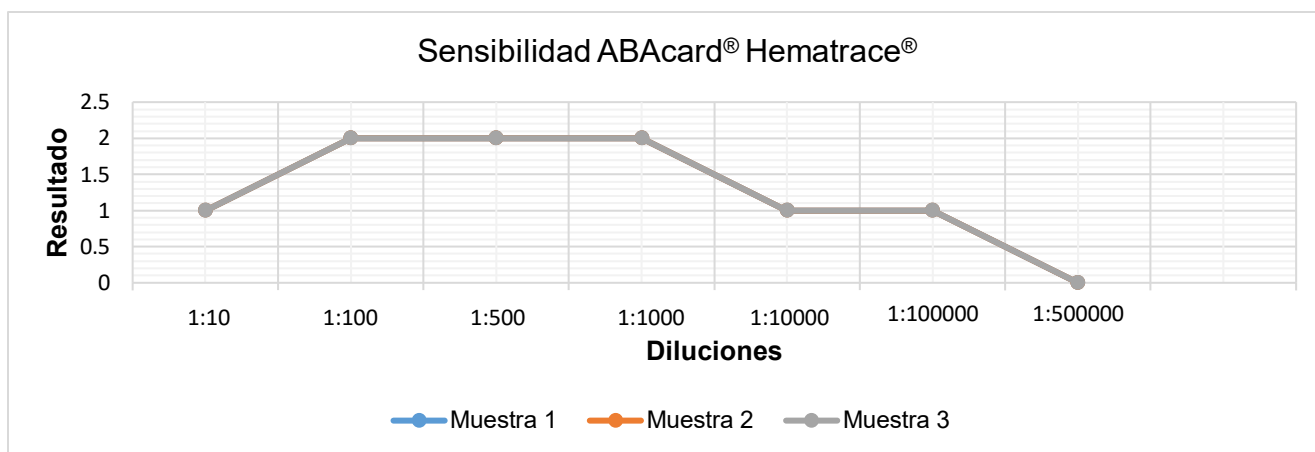


Gráfico 2. Sensibilidad de las muestras de sangre. Un positivo débil se basa en el desvanecimiento del color rojo visualizado en la posición de prueba (T) en la placa de prueba en comparación con el color rojo de la posición de control (C). Cuanto menos aparente sea el color rojo, más débil fue considerado el resultado y registrado como tal. Positivo = 2, débilmente positivo = 1 y negativo = 0.

En el estudio de especificidad se obtuvieron resultados negativos para la presencia de hemoglobina en las muestras de saliva y semen evaluadas (Tabla 2).

Tabla 2. Especificidad ABACard® HemaTrace®

Descripción de la muestra	Resultado
Muestra 1 Saliva 1:500	Negativo
Muestra 2 Saliva 1:500	Negativo
Muestra 1 Semen 1:500	Negativo
Muestra 2 Semen 1:500	Negativo

SALIgAE®

Se muestran los controles de calidad de la prueba SALIgAE® para evaluar la sensibilidad y especificidad de la misma (Figura 3).



Figura 3. Controles de calidad de la prueba SALIgAE®.

En el Gráfico 3 se observan las diferentes diluciones realizadas para evaluar la sensibilidad, las diluciones que presentaron un resultado positivo fueron 1:10 y 1:100 para las tres muestras, sin embargo la dilución 1:250 y 1:500 aún se consideran débilmente positivas aunque se observe un color más claro, por lo que estableció el corte en la dilución 1:500.

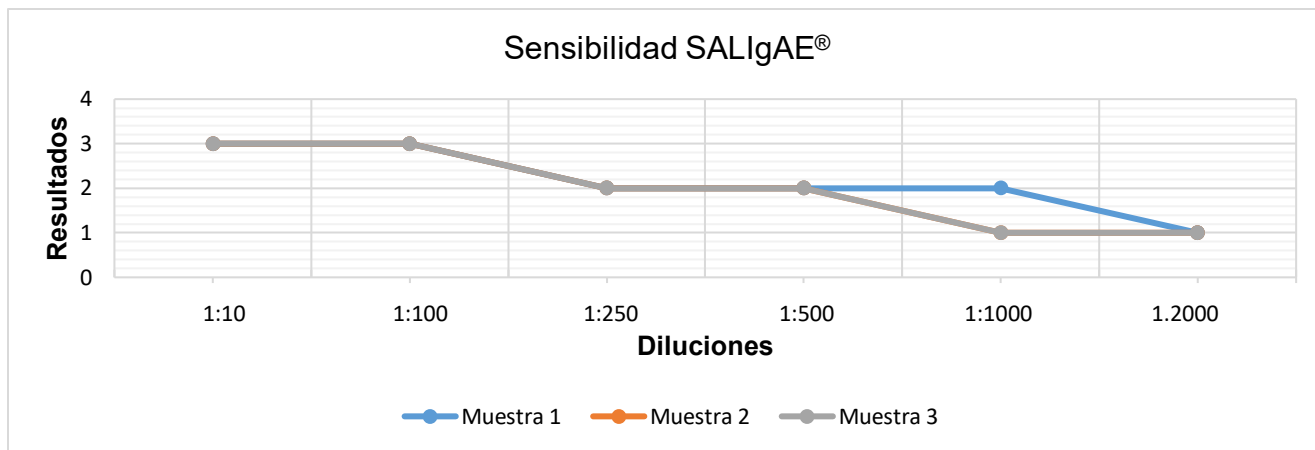


Gráfico 3. Sensibilidad de las muestras de saliva. Un resultado positivo se presenta con un color amarillo, el resultado débilmente positivo se observa cuanto menos aparente sea el color y el negativo no presenta color. Positivo = 3, débilmente positivo = 2, difícil de interpretar = 1 y negativo = 0.

En el estudio de especificidad se obtuvieron resultados negativos para la presencia de amilasa en las muestras de semen evaluadas (Tabla 3).

Tabla 3. Especificidad SALIgAE®

Descripción de la muestra	Resultado
Muestra 1 Semen 1:500	Negativo
Muestra 2 Semen 1:500	Negativo

II. Validación del método de extracción y purificación con el sistema Tissue and Hair Extraction Kit y DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16

En la evaluación de reproducibilidad del método de extracción de ADN utilizando diversas muestras con el sistema Tissue and Hair Extraction Kit y sometidas a diferentes corridas de purificación con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, se obtuvo la variación de la concentración de ADN autosómico y de cromosoma Y, cuantificadas con el sistema Plexor® HY (Tabla 4), para demostrar la reproducibilidad de la cantidad del ADN obtenido.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la cuantificación de muestras extraídas con Tissue and Hair Extraction Kit y la purificadas con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

Muestra	Corrida	Concentración autosómica (ng/μL)	Desviación estándar	CV (%)	Concentración Y (ng/μL)	Desviación estándar	CV (%)
Pelo 1	1	2.1820	0.1715	8.6374	2.5520	0.4959	17.4792
	2	1.9100			3.4100		
	3	1.8650			2.5500		
Pelo 2	1	0.9767	0.2345	23.3971	2.3810	0.6489	26.0193
	2	1.2490			3.1920		
	3	0.7820			1.9090		
Sangre 1	1	4.5170	4.8415	51.7383	5.4160	6.9509	52.7971
	2	9.3560			15.2300		
	3	14.200			18.8500		
Sangre 2	1	2.2630	0.9043	28.4190	4.2270	6.0112	73.9634
	2	3.2130			5.1050		
	3	4.0710			15.050		
Semen 1	1	7.8880	4.3130	41.7528	17.0500	7.3105	34.1457
	2	7.7920			17.3300		
	3	15.3100			29.8500		
Semen 2	1	11.9400	1.1292	10.3992	37.4000	2.5346	7.0570
	2	10.9500			32.9900		
	3	9.6870			37.3600		
Saliva 1	1	4.6480	0.4226	9.24279	8.2610	1.4756	19.4241
	2	4.9520			8.6240		
	3	4.1170			5.9060		
Saliva 2	1	2.5930	0.9144	34.2450	8.0750	2.3707	30.6253
	2	3.6210			9.9270		
	3	1.7970			5.2210		

Los genómicos obtenidos del estudio de reproducibilidad fueron amplificados con el sistema PowerPlex® Fusion para demostrar la reproducibilidad de la calidad del ADN, mostrando perfiles STR con genotipos consistentes, donde se obtuvieron perfiles completos en un 70% de las muestras (Gráfico 4). Por último demostrando que no hubo contaminación cruzada entre las muestras (Tabla 5).

Tabla 5. Alelos obtenidos de las muestras de la prueba de reproducibilidad extrañas con Tissue and Hair Extraction Kit y purificadas con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

		Locus																								
		Muestra	Corrida																							
			Amelogenina	D3S1358	D1S1656	D2S441	D10S1248	D13S317	Penta E	D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	Vwa	D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	DYS391	D8S1179	D12S391	D19S433	FGA	D22S1045
Pelo 1	1	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,-	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	2	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	3	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
Pelo 2	1	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	2	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	3	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
Sangre 1	1	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	2	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	3	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
Sangre 2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	3	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
Semen 1	1	X,Y	14,17	13,18.3	10,10	14,16	10,11	11,12	9,12	14,15	19,20	11,12	9,14	6,6	16,16	32.2,32.2	10,10	11,11	8,11	10	8,10	18,24	13,14	22,25	11,16	
	2	X,Y	14,17	13,18.3	10,10	14,16	10,11	-	9,12	14,15	19,20	11,12	9,14	6,6	16,16	32.2,32.2	10,10	11,11	8,11	10	8,10	18,24	13,14	22,25	11,-	
	3	X,Y	14,17	13,18.3	10,10	14,16	10,11	11,12	9,12	14,15	19,20	11,12	9,14	6,6	16,16	32.2,32.2	10,10	11,11	8,11	10	8,10	18,24	13,14	22,25	11,16	
Semen 2	1	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	2	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	3	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
Saliva 1	1	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	2	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
	3	X,Y	15,15	13,14	11,15	13,15	9,11	12,15	11,11	12,14	20,23	11,11	12,13	6,9,3	16,17	29,32.2	9,10	12,,12	8,11	10	12,15	19,19	13,13.2	20,23	15,16	
Saliva 2	1	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,-	-	13,14	17,18	14,15	22,25	-	
	2	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	
	3	X,Y	15,16	14,15	10,11	14,16	9,11	14,14	9,12	13,14	18,19	11,12	9,12	6,7	16,16	28,29	11,13	11,13	8,11	10	13,14	17,18	14,15	22,25	15,16	

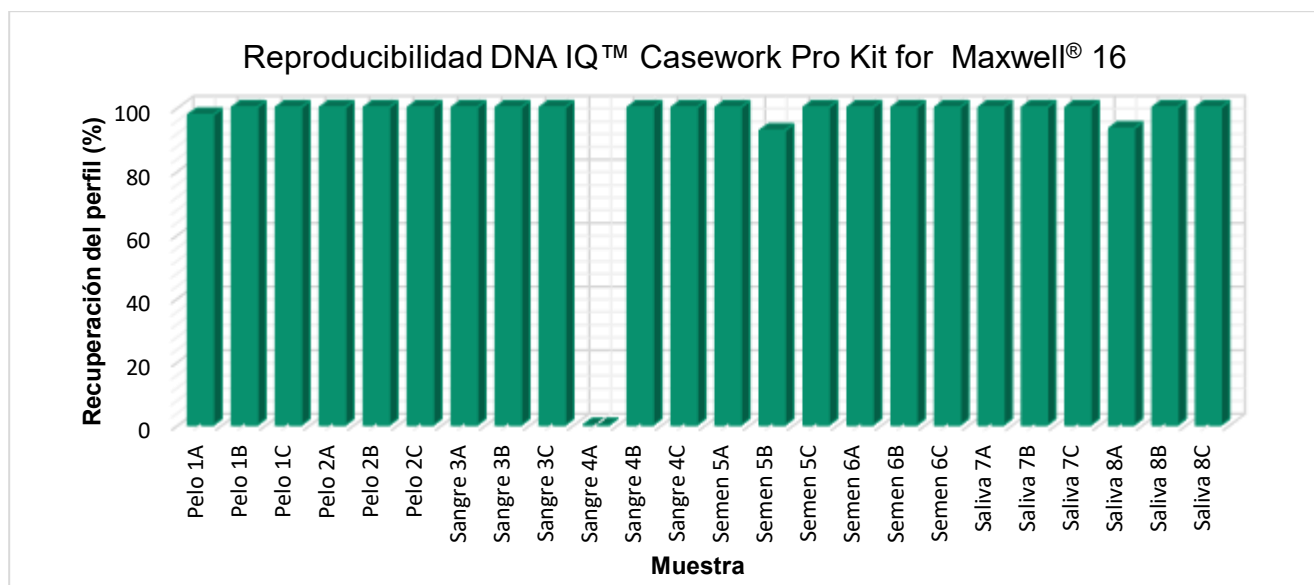


Gráfico 4. Recuperación de perfiles obtenidos de muestras extraídas con Tissue and Hair Extraction Kit y purificadas con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

Resultados de ADN cuantificable de las diluciones de dos tipos de muestras: sangre y semen. Los rendimientos de ADN fueron variables dependiendo del tipo de muestra y las diluciones (Tabla 6), demostrando que con estos sistemas se pueden extraer y purificar cantidades mínimas como las encontradas normalmente en el área forense.

Tabla 6. Rendimiento de ADN obtenido de la extracción con Tissue and Hair Extraction Kit y purificadas con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

Muestra	Dilución	Corrida	Concentración autosómica (ng/μL)	Concentración Y (ng/μL)
Sangre	1:50	1	0.0547300	0.057510
		2	0.0399400	0.047210
		3	0.0403800	0.050480
	1:500	1	0.0015600	0.004703
		2	0.0007222	0.003272
		3	0.0019770	0.001820
	1:5000	1	N/A	N/A
		2	N/A	N/A
		3	0.0003773	N/A
Semen	1:50	1	0.2589000	0.433800
		2	0.2120000	0.313700
		3	0.2506000	0.303200
	1:500	1	0.0025470	0.004068
		2	0.0006770	0.001690
		3	0.0037030	0.005217
	1:5000	1	N/A	N/A
		2	N/A	N/A
		3	0.0008050	N/A

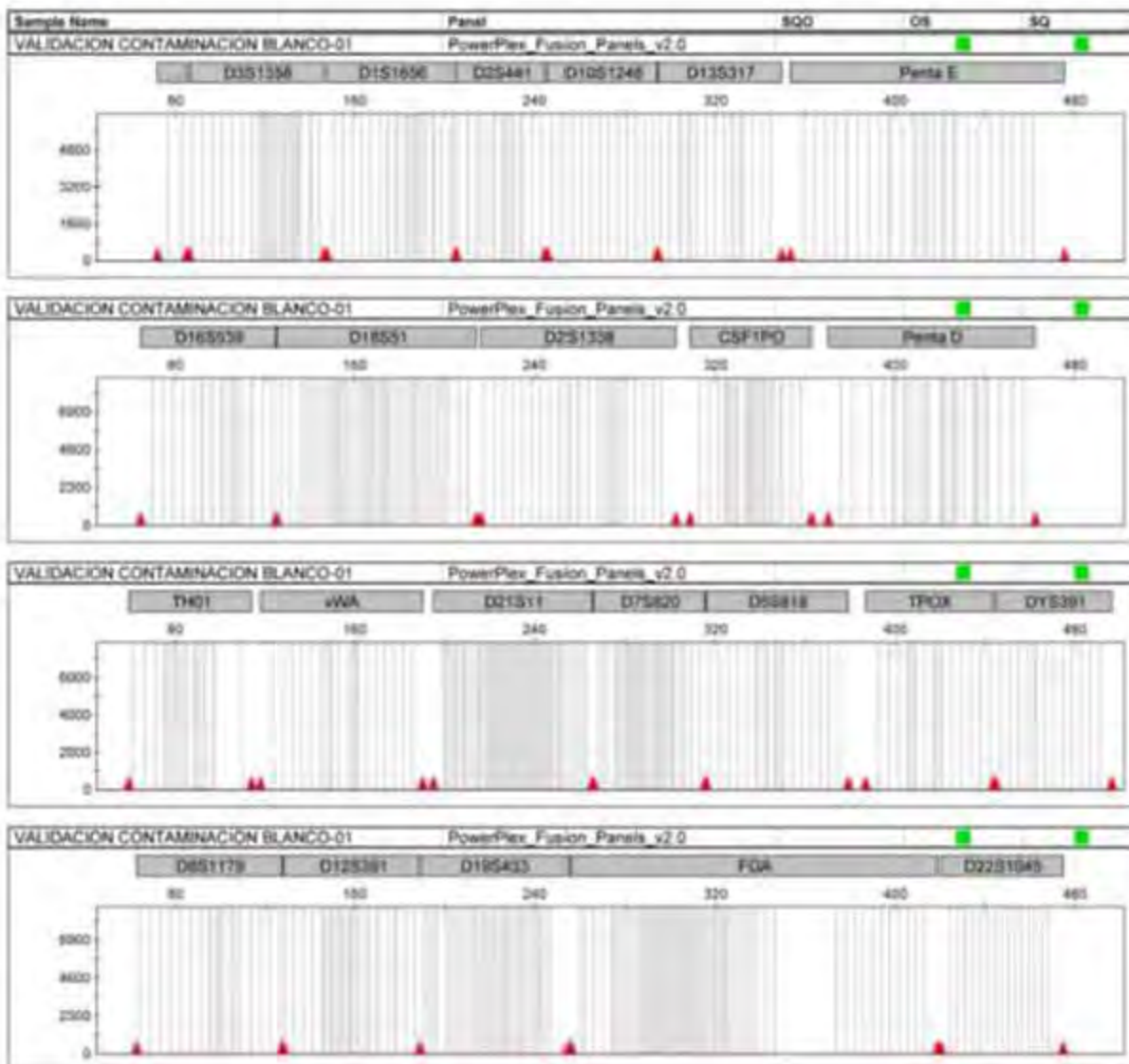


Gráfico 5. Electroferograma de blanco de extracción y purificación para la evaluación de contaminación de la validación del método de extracción y purificación con los sistemas Tissue and Hair Extraction Kit y DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

III. Validación del método de extracción con Bone Incubation® Buffer y el tratamiento de muestras de hueso

Los resultados muestran la cantidad de ADN autosómico y de cromosoma Y recuperado de 31 restos óseos, extraído con Bone Incubation® Buffer y purificadas con DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, con tratamiento previo de las muestras que incluyó lavado y descalcificación (Tabla 7) y la recuperación de alelos STR amplificados con el sistema PowerPlex® Fusion (Gráfico 6).

Tabla 7. Resultados de cuantificación de ADN de muestras de hueso extraídas con Bone Incubation® Buffer.

Muestra	Concentración autosómica (ng/μL)	Concentración Y (ng/μL)
1	0.0031220	0.005806
2	0.0488900	0.047200
3	0.0007215	0.001334
4	0.0098350	0.016270
5	0.1967000	0.252100
6	0.0014190	N/A
7	0.0369200	N/A
8	0.0267500	0.074260
9	0.1402000	0.054210
10	1.2290000	0.954800
11	N/A	N/A
12	N/A	N/A
13	N/A	N/A
14	0.0200900	0.023110
15	0.0181600	0.005389
16	0.0048740	0.001890
17	0.0050740	0.006066
18	1.2800000	0.967200
19	0.0527100	0.095350
20	N/A	N/A
21	0.4592000	0.429700
22	0.0036710	N/A
23	0.0747200	0.122300
24	0.0058060	0.004248
25	0.1384000	0.061250
26	0.4737000	0.847900
27	0.3330000	0.343800
28	0.0444400	N/A
29	0.0686000	N/A
30	0.0231900	0.032720
31	0.1576000	0.227400

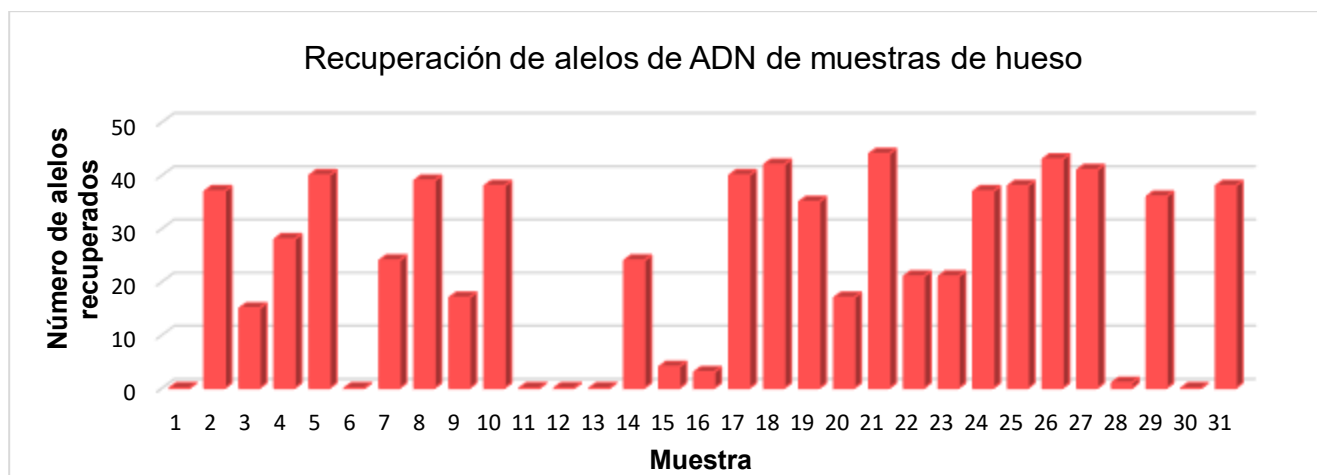


Gráfico 6. Número de alelos recuperados con el sistema PowerPlex® Fusion de muestras de hueso extraídas con Bone Incubation® Buffer.

IV. Validación del uso de papel FTA® para muestras de referencia y lavado del papel

En la amplificación directa de un punzón de 1.2 mm de papel FTA® con muestra de sangre, usando 26 ciclos en el perfil de amplificación, 15 µL de volumen de reacción, los resultados muestran la altura promedio de alelos obtenida en todas las muestras (Gráfico 7) y el porcentaje de recuperación del perfil, con la amplificación exitosa, recuperando perfiles completos en un todas las muestras amplificadas (Gráfico 8).

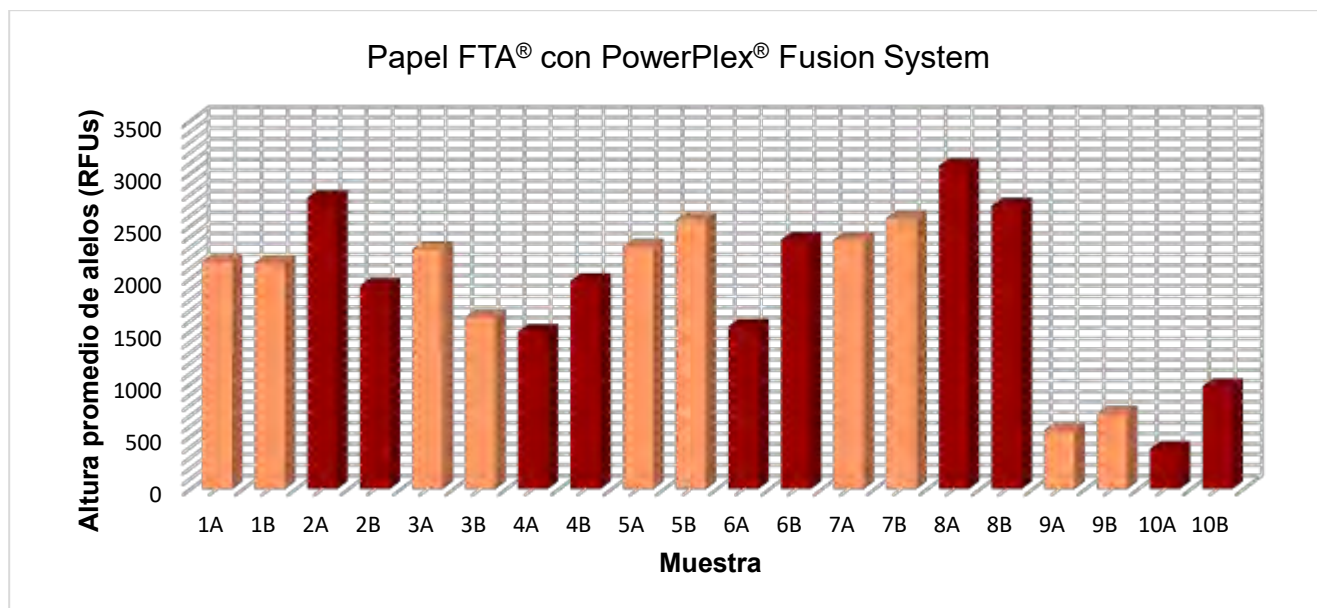


Gráfico 7. Altura promedio de alelos de muestras de sangre en papel FTA amplificadas con PowerPlex® Fusion System.

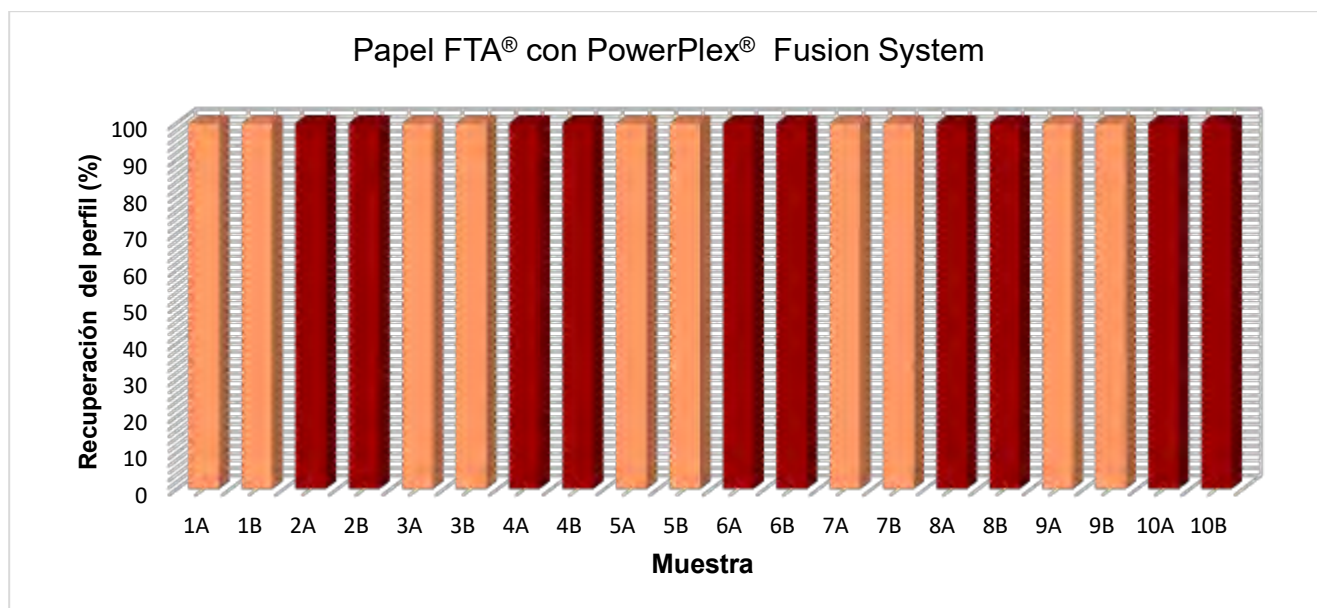


Gráfico 8. Recuperación del perfil porcentual de muestras de sangre en papel FTA amplificadas con PowerPlex® Fusion System.

En la amplificación de un punzón de 1.2 mm de papel FTA® con muestra de sangre previamente lavado con FTA Reagent para la eliminación de hemoglobina, usando 26 ciclos en el perfil de amplificación, 15 µL de volumen de reacción, los resultados muestran la altura promedio de alelos obtenida en todas las muestras (Gráfico 9) y el porcentaje de recuperación del perfil, con la amplificación exitosa, recuperando perfiles completos en un 100% de las muestras amplificadas (Gráfico 10).

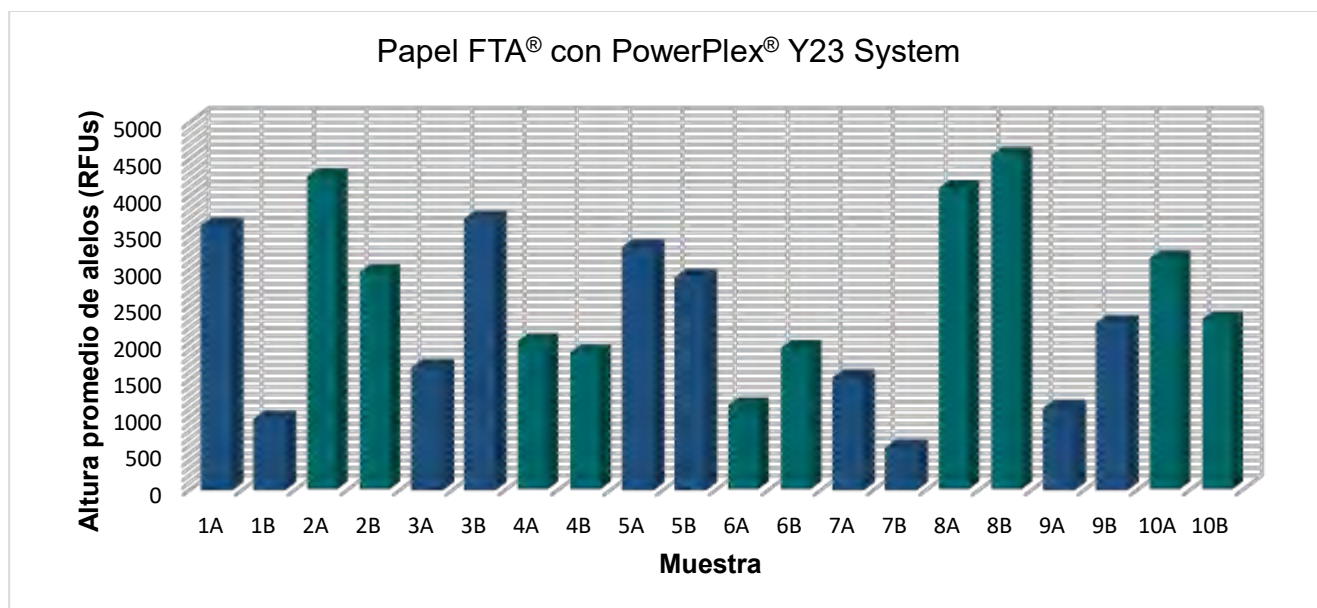


Gráfico 9. Altura promedio de alelos de muestras de sangre en papel FTA con PowerPlex® Y23 System.

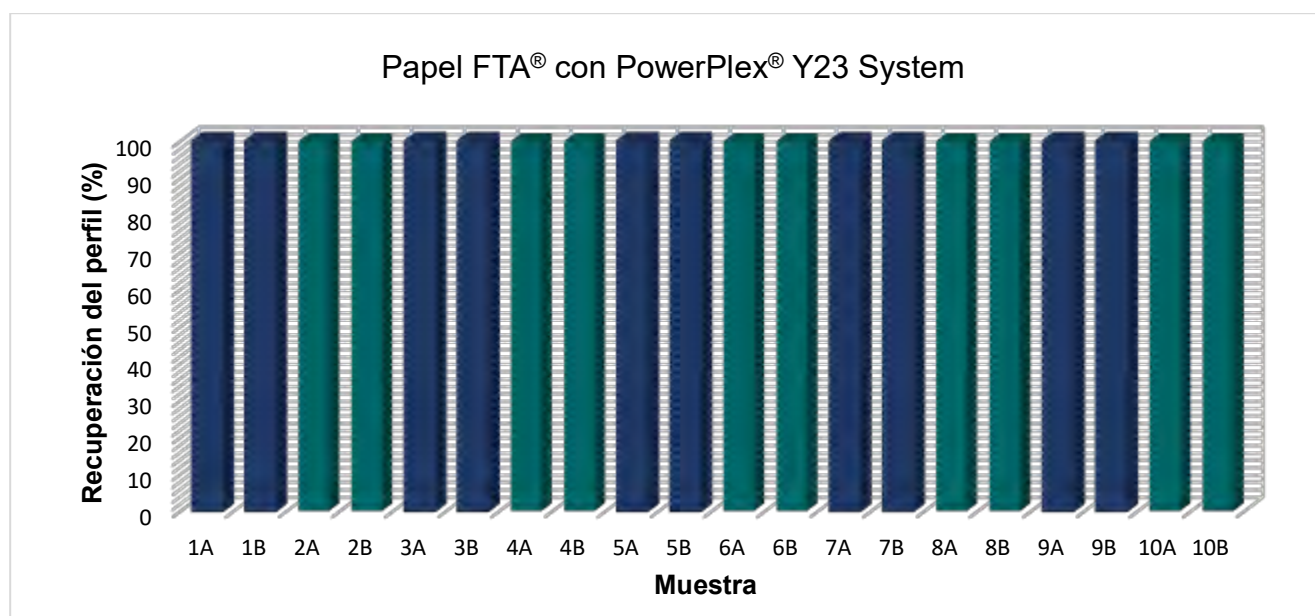


Gráfico 10. Recuperación de alelos porcentual de muestras de sangre en papel FTA amplificadas con PowerPlex® Y23 System.

V. Validación método de cuantificación con el sistema Plexor® HY y los equipos Biomek® 300 y Stratagene MX3005P®

Comparación de la reproducibilidad intra e inter placas usando el sistema Plexor® HY, cuantificando diferentes concentraciones de ADN masculino preparadas con el equipo Biomek® y sometidas a diferentes ejecuciones en el equipo de QPCR Stratagene MX3005P®, mostrando la desviación estándar el coeficiente de variación.

Tabla 8. Reproducibilidad de Plexor® HY System intra e inter placas con el equipo Stratagene MX3005P®.

Corrida	Concentración autosómica (ng/μL)	Desviación estándar	CV (%)	Concentración Y (ng/μL)	Desviación estándar	CV (%)
1	0.02032091	0.0074	33.2685	0.01924954	0.0049	23.9554
	0.02976143			0.0233548		
	0.02536193			0.02173547		
	0.01056042			0.01281214		
	0.02648082			0.02567265		
	0.38471546	0.0559	11.8020	0.48102915	0.0838	17.8545
	0.49040134			0.53508970		
	0.51863459			0.56413111		
	0.51902964			0.39274000		
	0.45777590			0.37543507		
	12.3260948	1.4327	11.1369	8.55890447	2.24814	19.8931
	12.1042582			10.0151323		
	14.1640515			10.9709895		
	11.1835280			12.6323718		
	14.5464035			14.3279838		

Continuación...

2	0.01823435	0.0029	21.0064	0.02236518	0.0015	6.4436
	0.01183211			0.02384367		
	0.01581761			0.02447512		
	0.01223904			0.02655347		
	0.01168135			0.02538714		
	0.23147221	0.0973	30.2617	0.57759231	0.0739	15.1243
	0.33428483			0.52386764		
	0.22802316			0.37672422		
	0.46288673			0.49251444		
	0.35128902			0.47471735		
	10.6501604	1.2556	11.7849	8.81693993	2.4364	18.6967
	9.65144652			13.3364301		
	12.7354600			14.9956383		
	9.67345637			14.2688202		
	10.5647011			13.7390526		
3	0.01409884	0.0025	17.4951	0.01194268	0.0014	12.2479
	0.01078293			0.01002310		
	0.01577187			0.01188497		
	0.01776744			0.01375714		
	0.01480339			0.01347596		
	0.32306739	0.0635	19.1876	0.33017566	0.0336	11.6959
	0.31969145			0.28359433		
	0.24942448			0.24846254		
	0.42734918			0.26409635		
	0.33695094			0.31246266		
	12.4023052	1.7858	17.7037	6.14217381	1.9183	23.7172
	11.6328071			7.37561556		
	8.95750499			9.21366906		
	8.67938440			6.85736082		
	8.76434081			10.8528948		

Evaluación de la sensibilidad del sistema Plexor® HY, cuantificando genómico de ADN masculino para la preparación de diferentes cantidades y la posterior amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion. Los resultados muestran que el sistema Plexor® HY detectó sistemáticamente todas las cantidades de ADN y sólo en dos casos fue posible recuperar perfiles STR parciales cuando se usaron 0.131 y 0.045 ng de ADN (Gráfico 12), obteniendo promedios de las alturas de los alelos por debajo del umbral estocástico (Gráfico 11). .

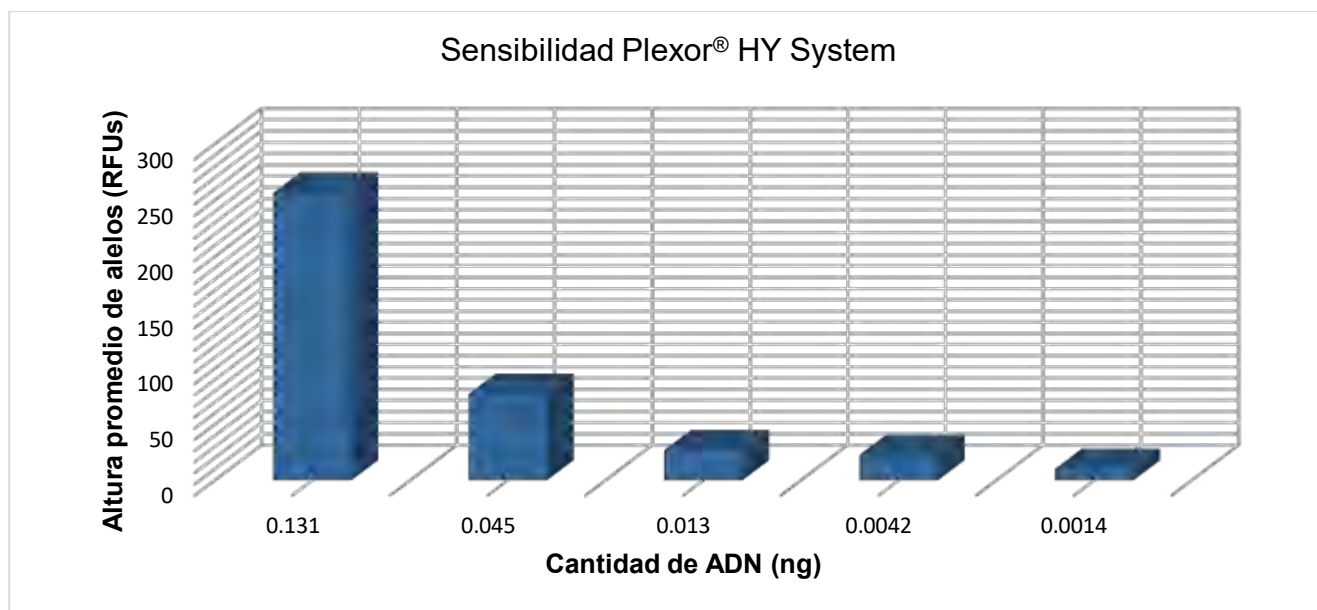


Gráfico 11. Altura promedio de alelos obtenida de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar sensibilidad de Plexor® HY System.

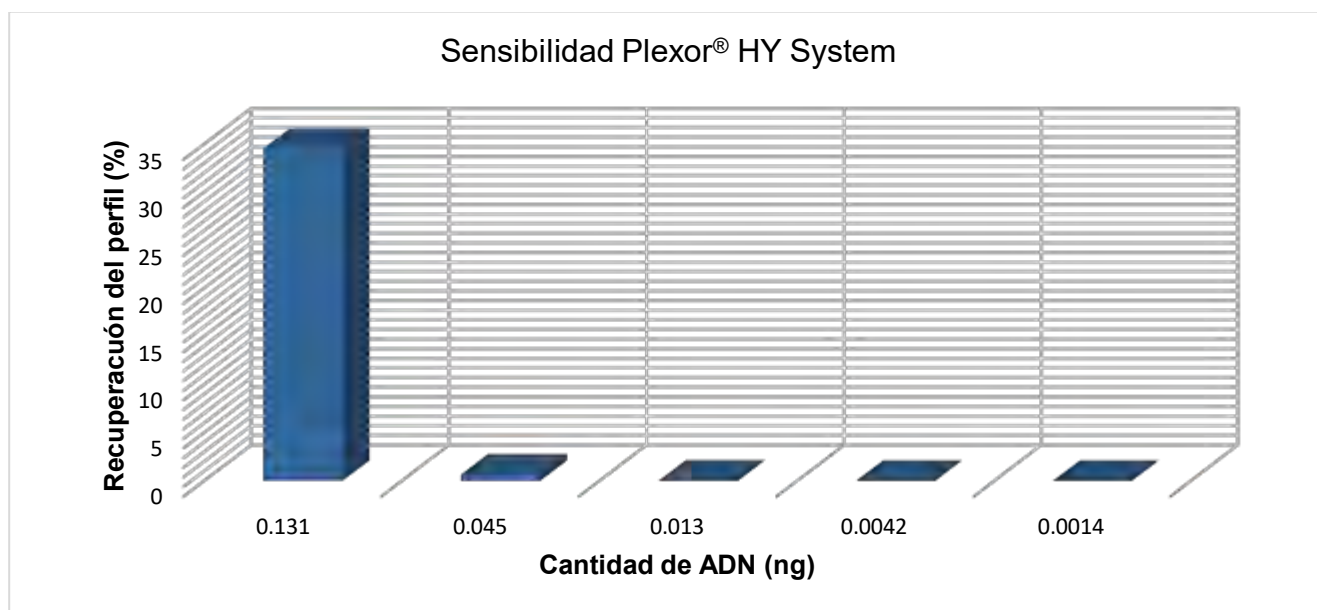


Gráfico 12. Recuperación de perfil porcentual de las de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar sensibilidad de Plexor® HY System.

VI. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion

En la evaluación de la sensibilidad del sistema PowerPlex® Fusion se probaron diferentes cantidades de ADN masculino. Las cantidades finales de ADN se amplificaron a 30 ciclos, de las cuales en 1 y 0.5 ng de ADN se observa la recuperación del 100% del perfil, en las siguientes cantidades el porcentaje cae ligeramente de forma gradual (Gráfico 14), y por consiguiente disminuye el promedio de la altura de los alelos recuperados (Gráfico 13), estableciendo el corte en la cantidad de 0.5 ng. De los resultados obtenidos se calcularon los parámetros utilizados para la interpretación de perfiles: límite de detección, umbrales analítico y estocástico, utilizados para determinar la recuperación de un perfil, porcentajes *stutter* (Tabla 9 y 9.1) que será de gran utilidad para la detección de mezclas y el límite de linealidad siendo mayor de 1 ng de ADN (Gráfico 15).

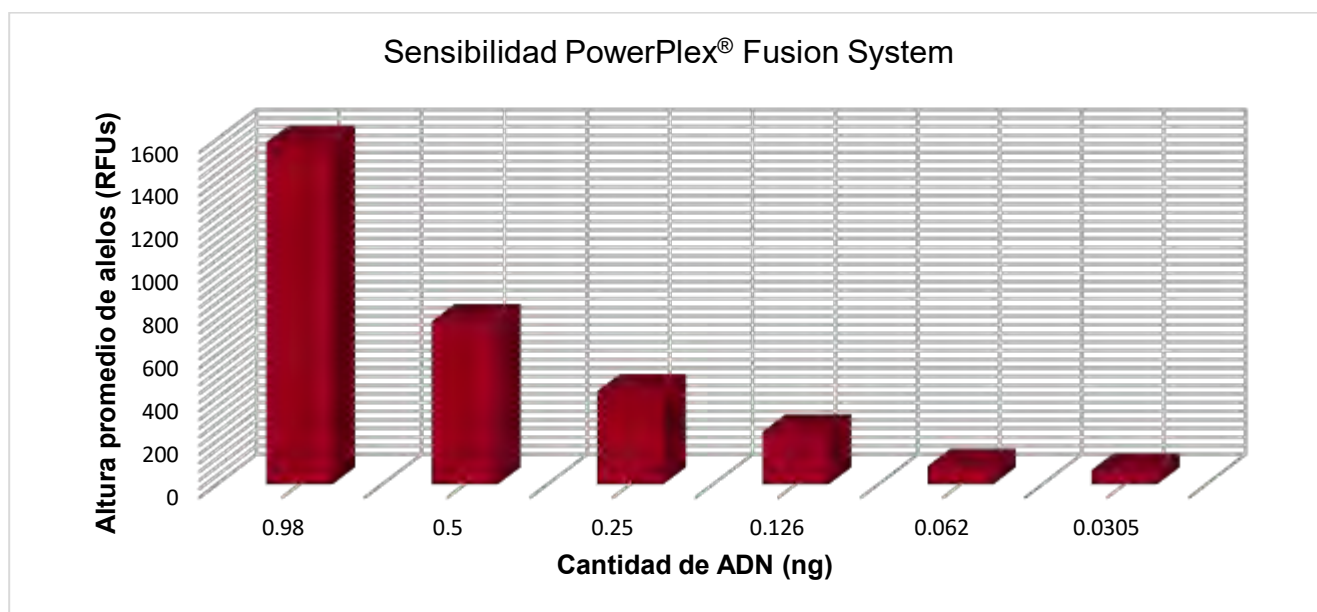


Gráfico 13. Altura promedio de alelos de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar PowerPlex® Fusion System.

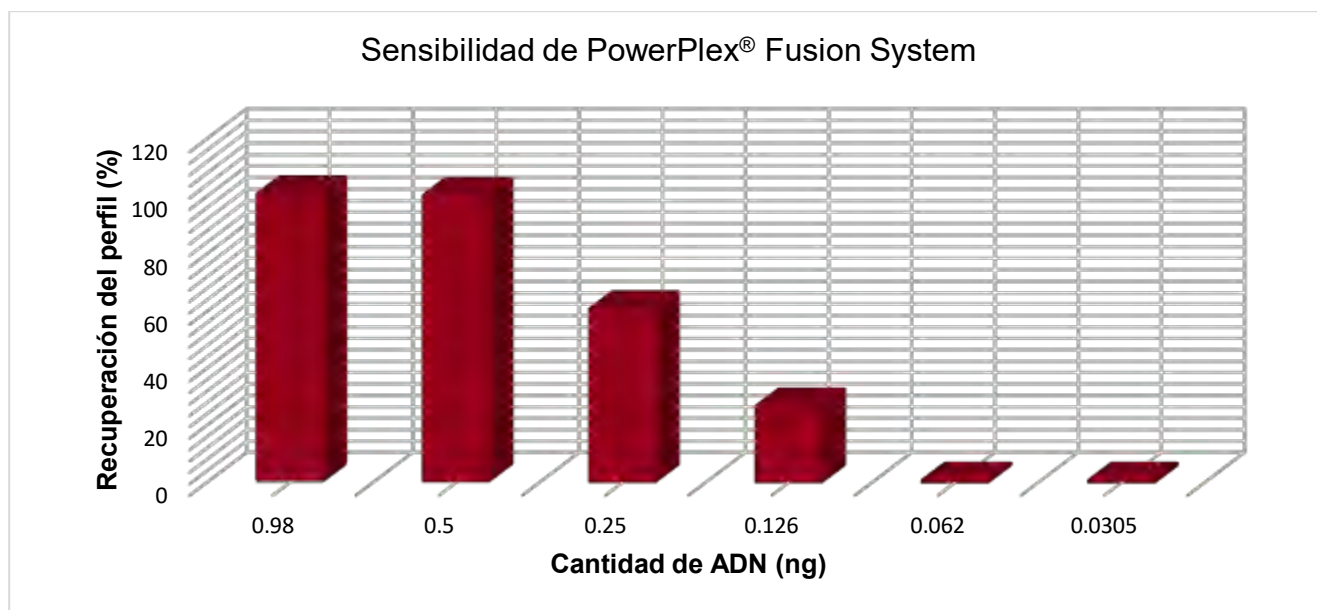


Gráfico 14. Recuperación del perfil porcentual de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar sensibilidad de PowerPlex® Fusion System.

Tabla 9. Parámetros calculados a partir de los datos del estudio de sensibilidad de PowerPlex® Fusion System.

Parámetro	Resultado
Cantidad óptima de ADN	0.5 ng
Límite de detección	17 RFUs
Umbral analítico	41 RFUs
Umbral estocástico	314 RFUs

Tabla 9.1 Porcentaje *stutter* de los marcadores de PowerPlex® Fusion System de 0.5 ng de ADN.

Marcador	Nucleótido	Porcentaje <i>stutter</i>
D3S1358	Tetra	10.08
D1S1656	Tetra	8.76
D2S441	Tetra	5.53
D10S1248	Tetra	8.13
D13S317	Tetra	3.35
Penta E	Penta	6.25
D16S539	Tetra	8.47
D18S51	Tetra	7.16
D2S1338	Tetra	8.19
CSF1PO	Tetra	6.13
Penta D	Penta	2.52
TH01	Tetra	2.03
vWA	Tetra	10.83
D21S11	Tetra	8.94
D7S820	Tetra	3.93
D5S818	Tetra	7.03
TPOX	Tetra	3.07
DYS391	Tetra	6.10
D8S1179	Tetra	8.53
D12S391	Tetra	12.70
D19S433	Tetra	6.42
FGA	Tetra	7.48
D22S1045	Tri	3.07

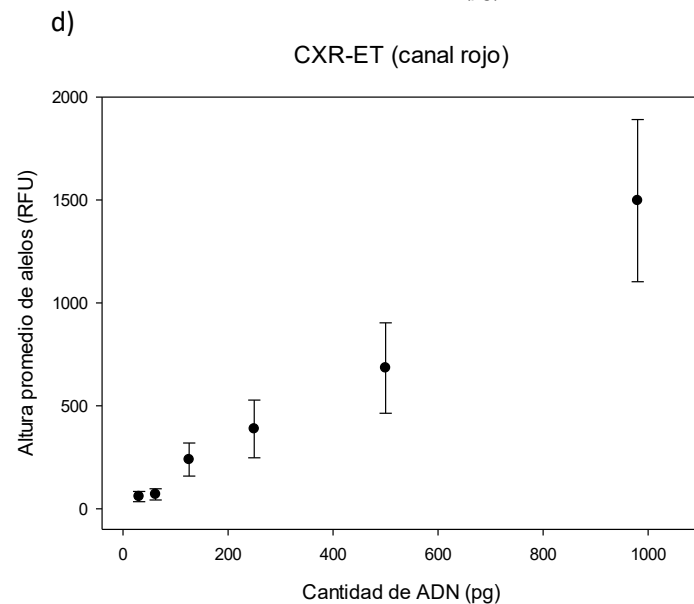
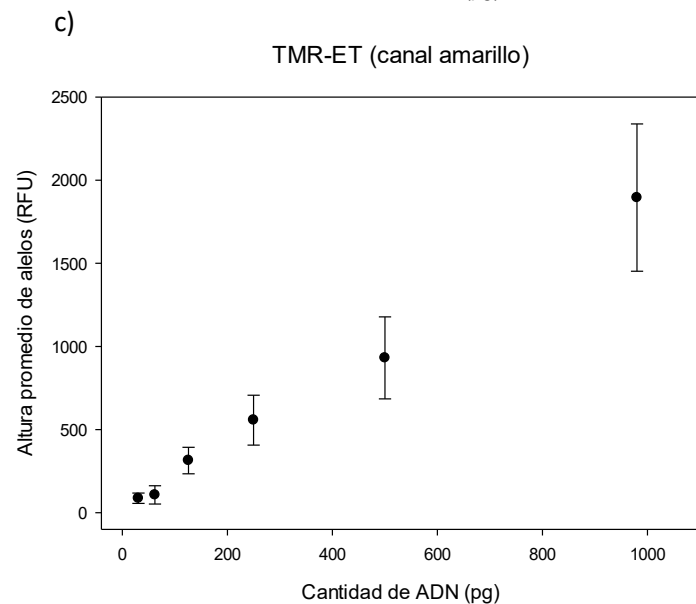
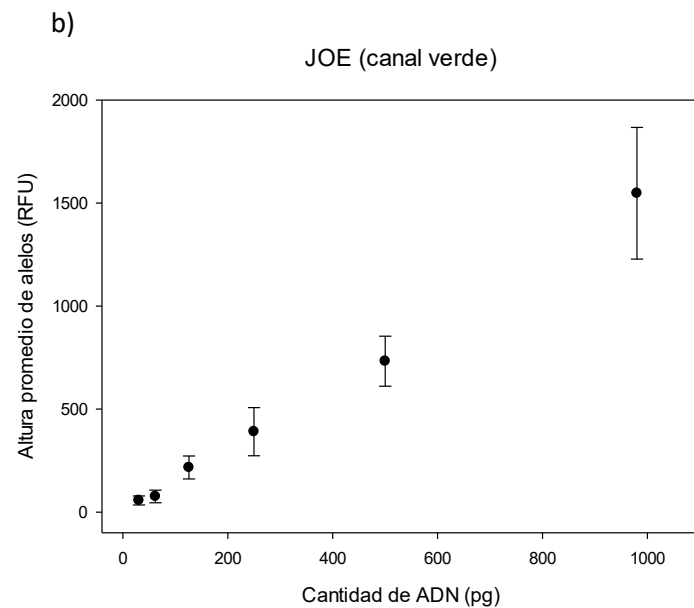
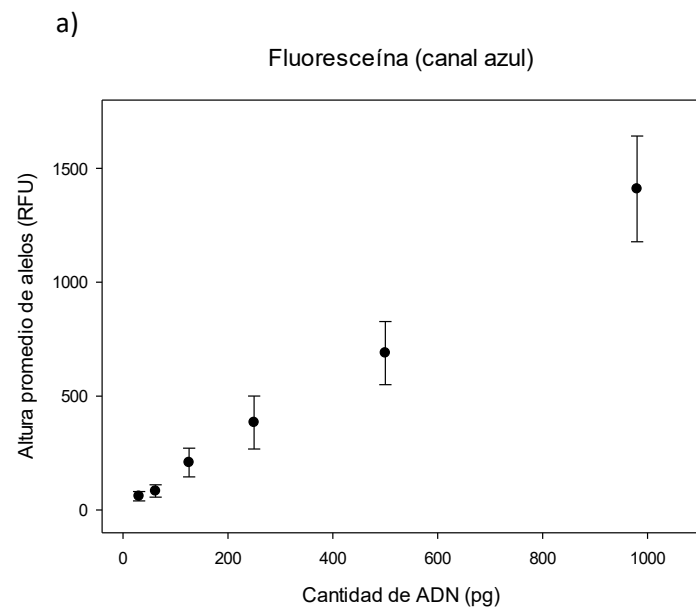


Gráfico 15. Límite de linealidad de cantidades entre 31.2 pg a 1000 pg de ADN: a) Fluoresceína (canal verde), b) JOE (canal verde), c) TMR-ET (canal amarillo) y d) CXR-ET (canal rojo).

En la evaluación de la precisión, se detectaron escalas alélicas en el analizador genético de la serie 3100 de Applied Biosystems. Se calcularon las desviaciones estándar del tamaño para cada alelo. Los resultados muestran que no se superan 0.5 pares de bases. La variabilidad del tamaño aumentó con el locus y el tamaño del alelo.

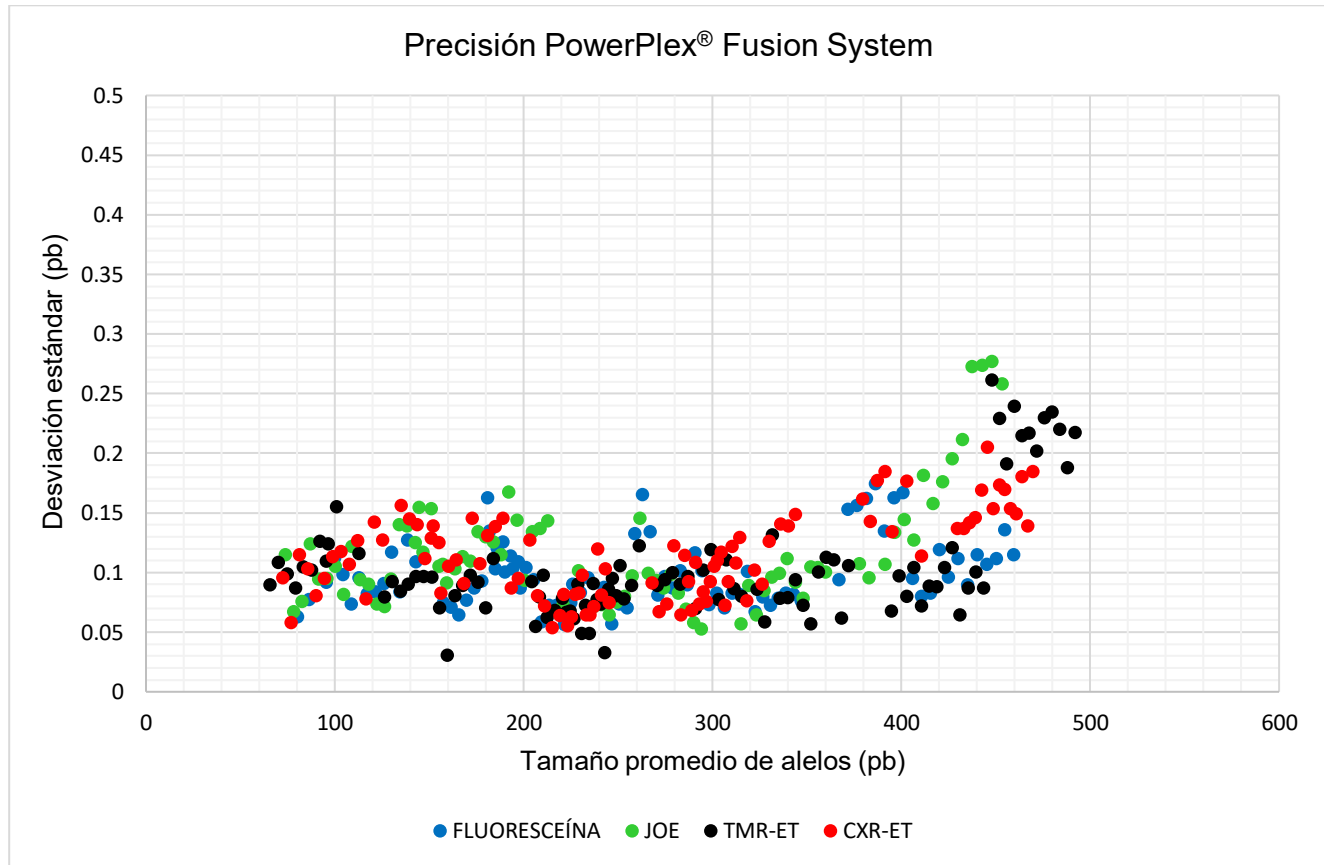


Gráfico 16. Desviación estándar de tamaño para cada alelo dentro de la escalera alélica PowerPlex® Fusion System. Se detectó un microlitro de escalera alélica utilizando un equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con una inyección de 5 segundos y voltaje de 3 kV.

En la evaluación de la exactitud, los resultados de la amplificación del control positivo del sistema PowerPlex® Fusion, indican ser concordantes al usar el producto dentro del laboratorio, ya que se observan perfiles idénticos a los que reporta Promega como referencia de dicho control, cuando se lo realiza uno o varios analistas (Tabla 10 y Gráfico 17). Y por último en la evaluación de contaminación, los resultados demuestran la ausencia de ADN exógeno (Gráfico 18).

Tabla 10. Tipificación del control positivo del sistema PowerPlex® Fusion System.

Locus	Referencia	Reproducibilidad	Repetibilidad
Amelogenina	X, Y	X, Y	X, Y
D3S1358	17, 18	17, 18	17, 18
D1S1656	12, 13	12, 13	12, 13
D2S441	10, 14	10, 14	10, 14
D10S1248	13, 15	13, 15	13, 15
D13S317	9, 11	9, 11	9, 11
Penta E	7, 14	7, 14	7, 14
D16S539	9, 13	9, 13	9, 13
D18S51	16, 18	16, 18	16, 18
D2S1338	22, 25	22, 25	22, 25
CSF1PO	12, 12	12, 12	12, 12
Penta D	12, 13	12, 13	12, 13
TH01	6, 9.3	6, 9.3	6, 9.3
Vwa	16, 19	16, 19	16, 19
D21S11	29, 31.2	29, 31.2	29, 31.2
D7S820	8, 11	8, 11	8, 11
D5S818	12, 12	12, 12	12, 12
TPOX	11, 11	11, 11	11, 11
DYS391	10	10	10
D8S1179	14, 15	14, 15	14, 15
D12S391	18, 23	18, 23	18, 23
D19S433	13, 14	13, 14	13, 14
FGA	20, 23	20, 23	20, 23
D22S1045	16, 16	16, 16	16, 16

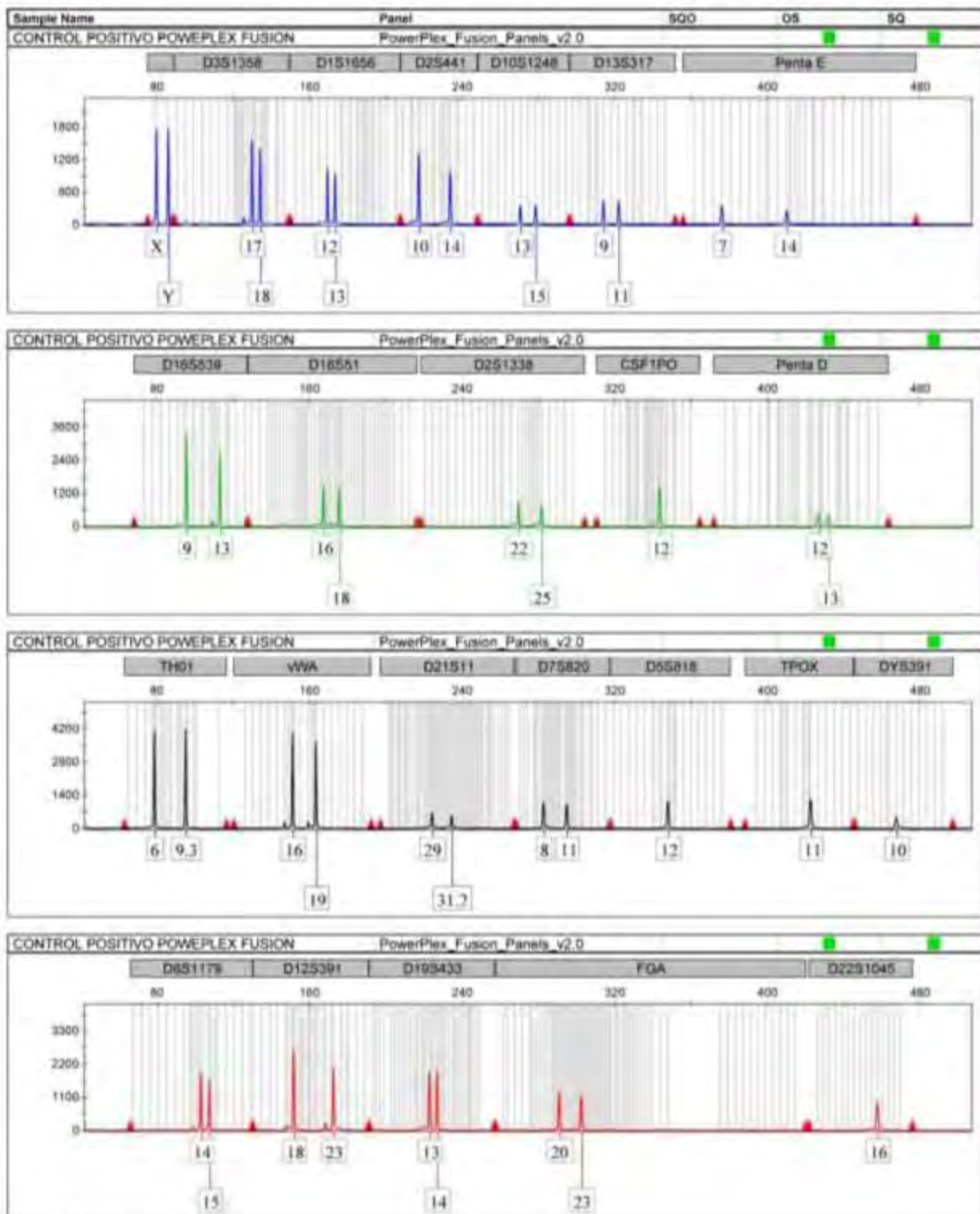


Gráfico 17. Electroferograma del control positivo de PowerPlex® Fusion System.

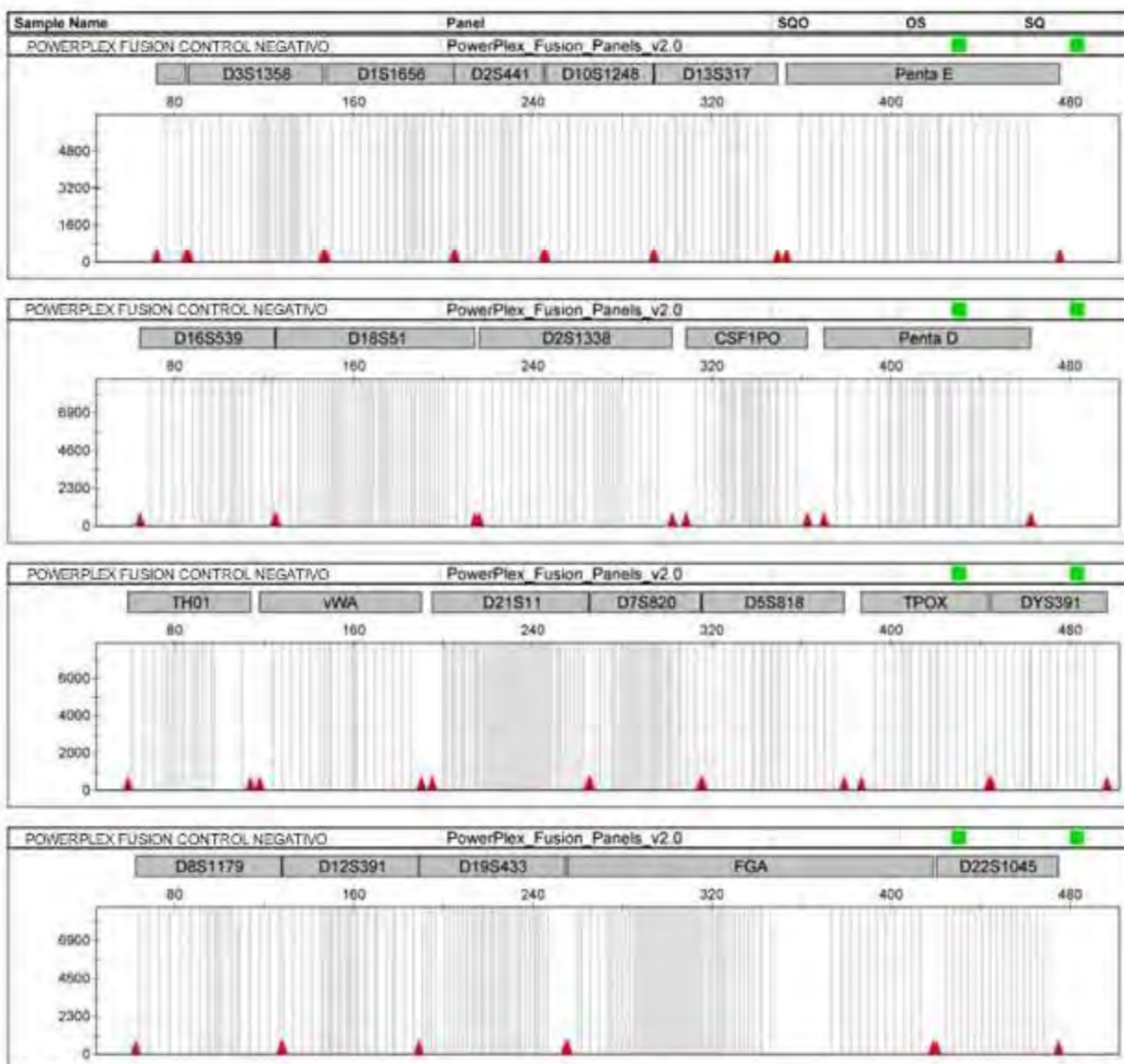


Gráfico 18. Electroferograma de blanco de reactivo sometido a Electroforesis Capilar durante la validación de PowerPlex® Fusion System.

VII. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Y23

En la evaluación de sensibilidad del sistema PowerPlex Y23, se usaron diferentes cantidades de ADN masculino, los datos muestran la recuperación de perfiles completos en 1, 0.5 y 0.25 ng de ADN, y en cantidades menores se presentaron perfiles parciales (Gráfico 20), con una disminución en el promedio de alturas (Gráfico 19), y el corte se estableció en 0.25 ng. Sin embargo, la cantidad óptima para el uso de este sistema es de 0.5 y 0.25 ng, de estas cantidad se calculó el límite de detección, umbral analítico (Tabla 11), el porcentaje *stutter* para la detección de perfiles de mezclas (Tabla 11.1) y el límite de linealidad siendo mayor a 1 ng (Gráfico 21).

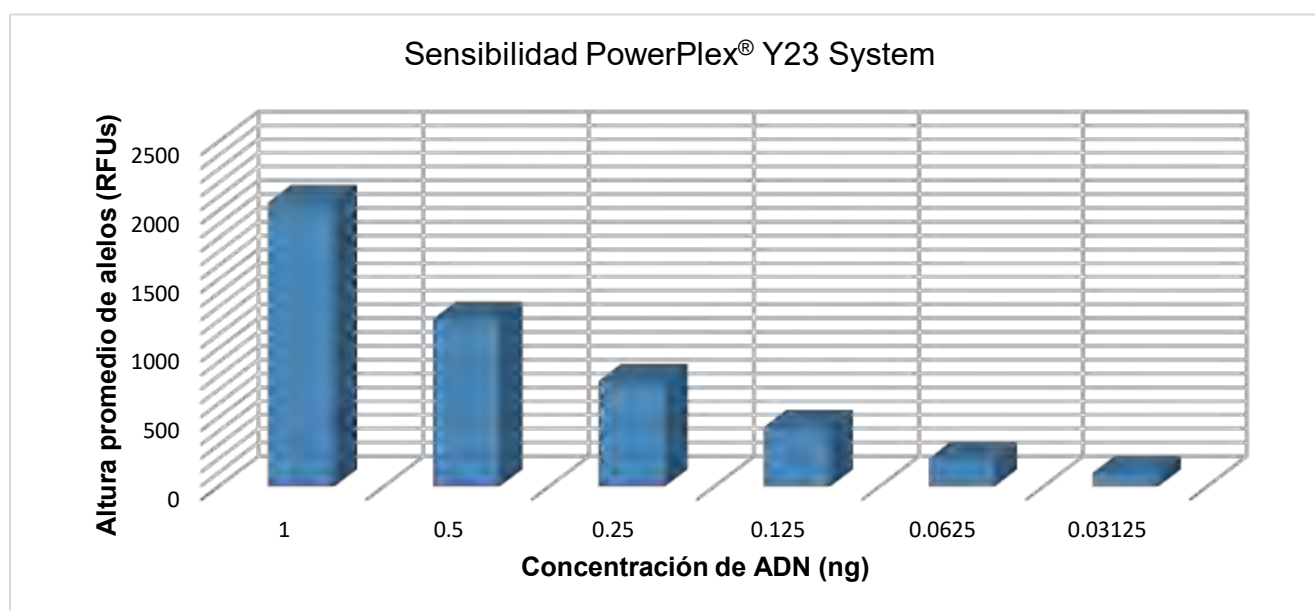


Gráfico 19. Altura promedio de alelos de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar PowerPlex® Y23 System.

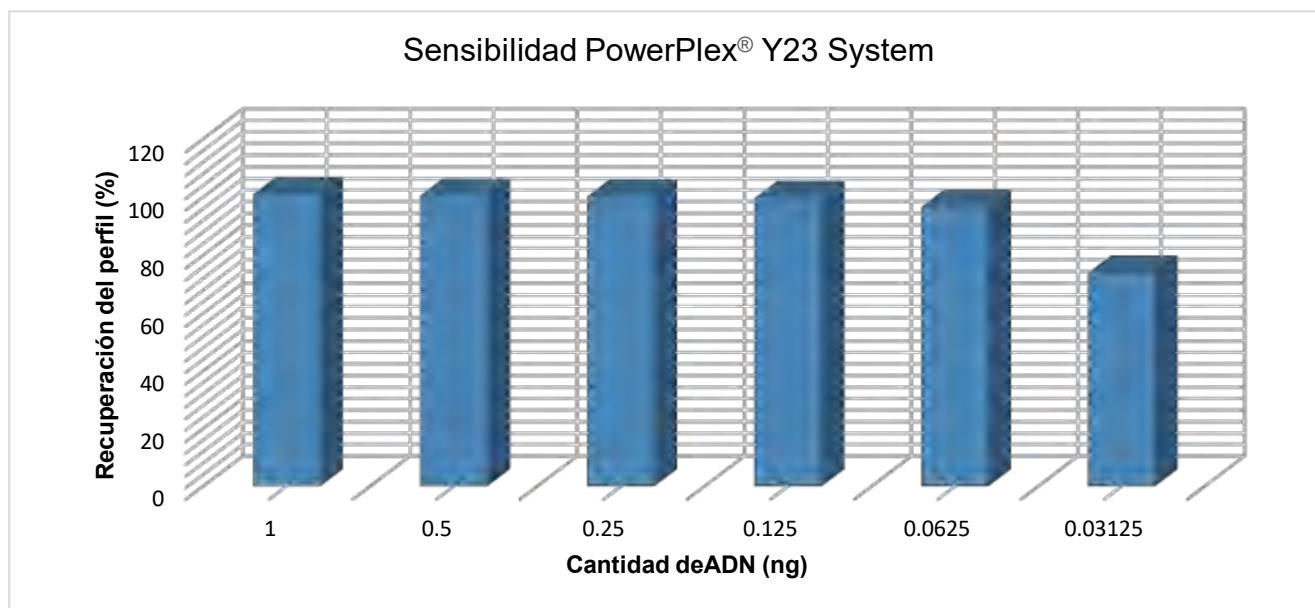


Gráfico 20. Recuperación de alelos porcentual de diferentes cantidades de ADN de muestras masculinas para evaluar sensibilidad de PowerPlex® Y23 System.

Tabla 11. Parámetros calculados a partir de los datos del estudio de sensibilidad de PowerPlex® Y23 System.

Parámetro	Resultado	
Cantidad óptima de ADN	0.25 ng	0.5 ng
Límite de detección	15 RFUs	19 RFUs
Umbral analítico	36 RFUs	44 RFUs

Tabla 11.1. Porcentaje de *stutter* de los marcadores de PowerPlex® Y23 para 0.25 y 0.5 ng de ADN.

Marcador	Nucleótido	Porcentaje <i>stutter</i> a 0.25 ng	Porcentaje <i>stutter</i> a 0.5 ng
DYS576	Tetra	9.89	10.04
DYS389 I	Tetra	6.68	5.96
DYS448	Tetra	2.56	2.19
DYS389 II	Tetra	13.24	13.46
DYS19	Tetra	6.22	5.86
DYS391	Tetra	7.22	7.72
DYS481	Tetra	19.84	20.11
DYS549	Tetra	7.81	7.90
DYS533	Tetra	6.76	6.26
DYS438	Tetra	3.17	2.67
DYS437	Tetra	4.50	4.40
DYS570	Tetra	10.20	10.25
DYS635	Tetra	5.95	5.56
DYS390	Tetra	8.16	8.44
DYS439	Tetra	6.85	6.06
DYS392	Tri	9.92	10.52
DYS643	Tetra	3.12	2.44
DYS393	Tetra	8.85	9.16
DYS458	Tetra	10.68	11.09
DYS385	Tetra	10.87	10.41
DYS456	Tetra	10.73	9.83
YGATAH4	Tetra	7.47	7.80

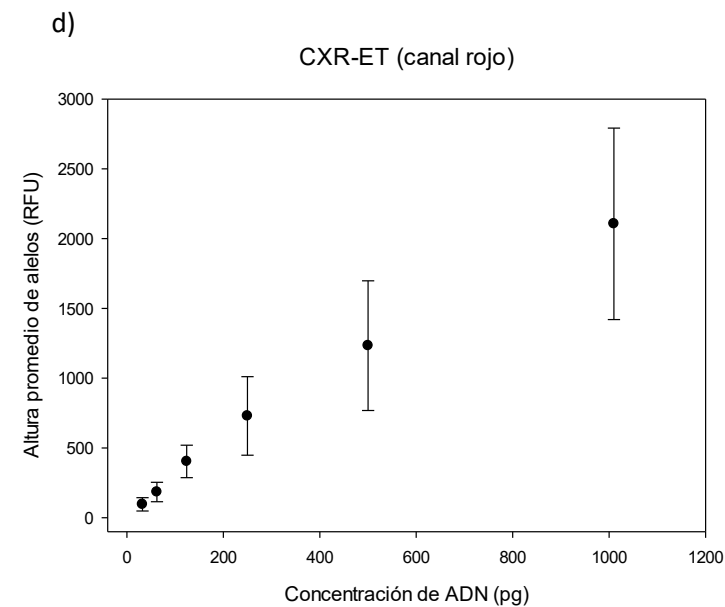
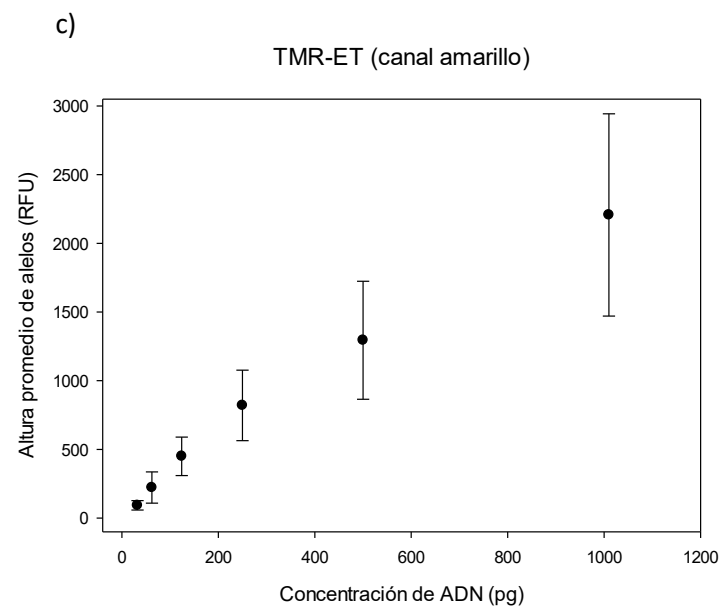
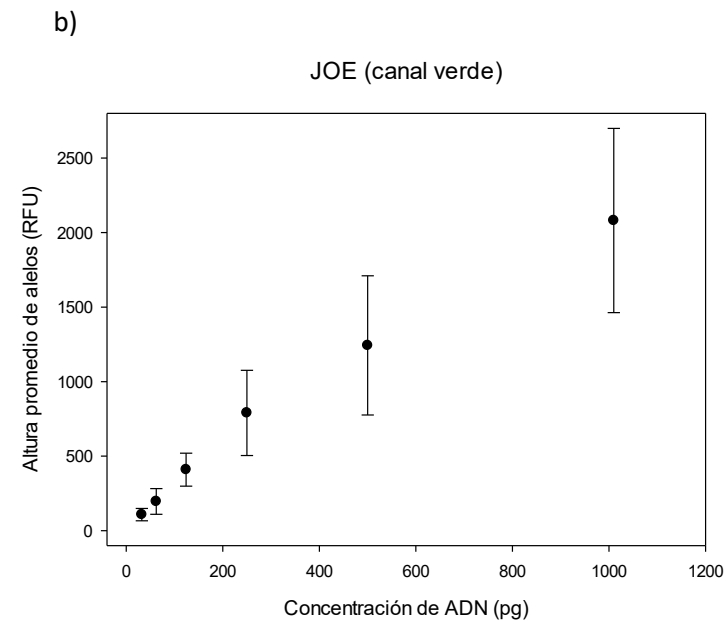
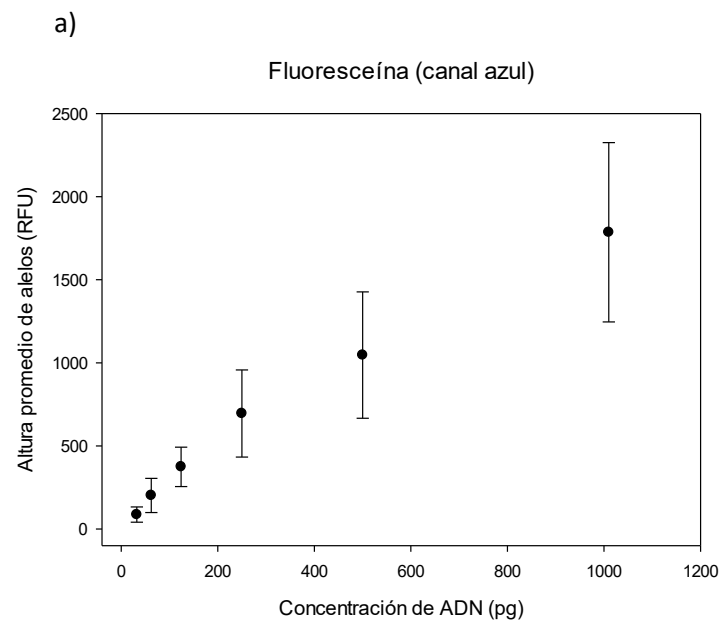


Gráfico 21. Límite de linealidad de cantidades entre 30 pg y 1000 pg de ADN: a) canal verde (Fluoresceína), b) canal verde (JOE), c) canal amarillo (TMR-ET) y d) canal rojo (CXR-ET).

La precisión del sistema PowerPlex® Y23 se calculó utilizando 10 escaleras alélicas. Se calcularon el promedio y la desviación estándar de los tamaños de pares de bases para cada alelo en cada locus. Se observa que el tamaño de todos los alelos caen dentro de ± 0.5 pares de bases en todas las inyecciones de escalera en el ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer utilizado en esta validación, demostrando un alto nivel de precisión.

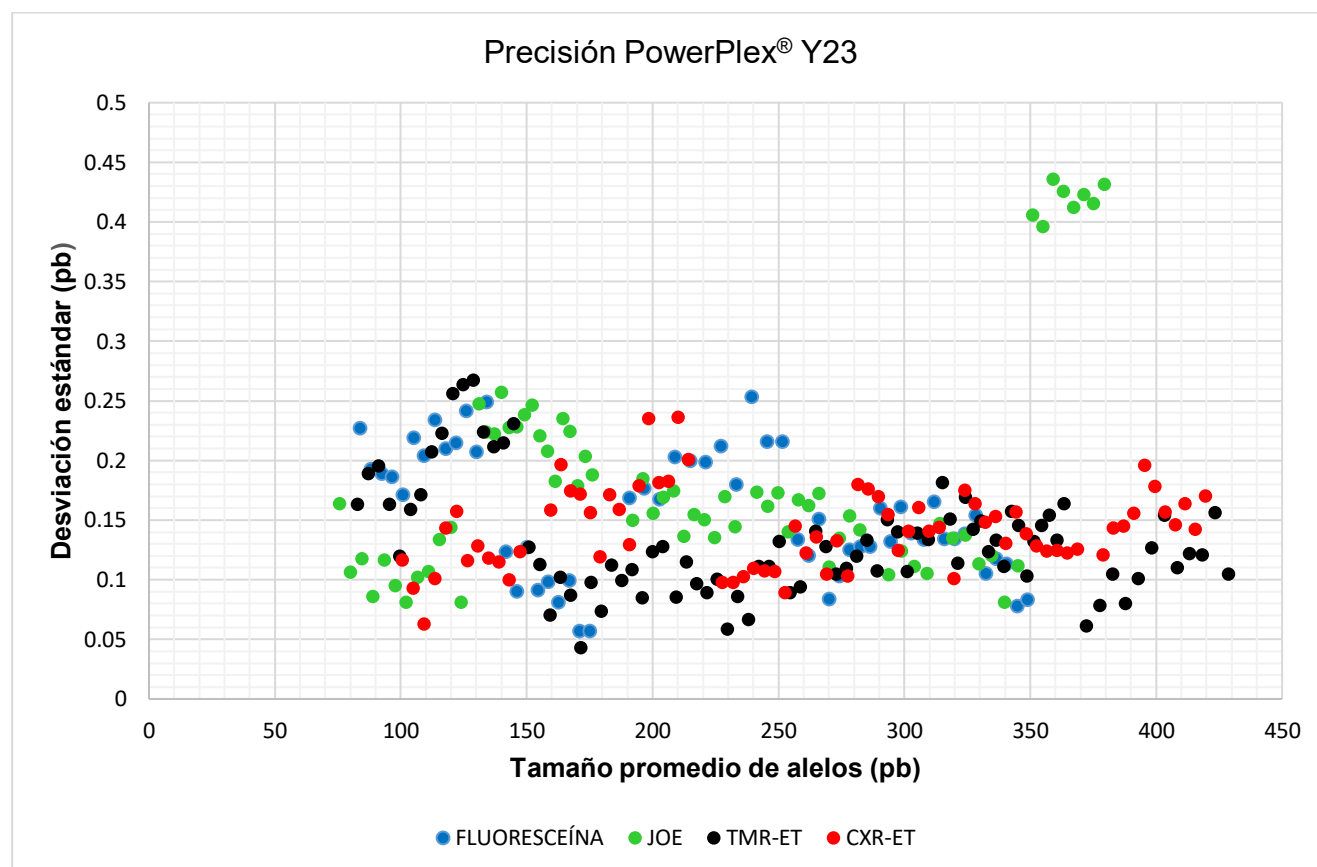


Gráfico 22. Desviación estándar de tamaño para cada alelo dentro de la escalera alélica PowerPlex® Y23 System. Se detectó un microlitro de escalera alélica utilizando un equipo ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer con una inyección de 5 segundos y voltaje de 3 kV.

En la evaluación de reproducibilidad se observa que el control positivo produjo el perfil de ADN esperado como lo reporta Promega, cuando fue realizado por diferentes analistas, lo que demuestra que el sistema es reproducible (Tabla 12 y Gráfico 23). Los controles negativos que se amplificaron junto con las muestras demostraron que estaban libres de contaminantes (Gráfico 24).

Tabla 12. Tipificación del control positivo del sistema PowerPlex® Y23 System.

Locus	Referencia	Reproducibilidad
DYS576	18	18
DYS389I	14	14
DYS448	19	19
DYS389II	31	31
DYS19	14	14
DYS391	10	10
DYS481	22	22
DYS549	13	13
DYS533	12	12
DYS438	9	9
DYS437	14	14
DYS570	17	17
DYS635	21	21
DYS390	24	24
DYS439	12	12
DYS392	13	13
DYS643	10	10
DYS393	13	13
DYS458	17	17
DYS385a/b	13,16	13,16
DYS456	17	17
Y-GATA-H4	11	11

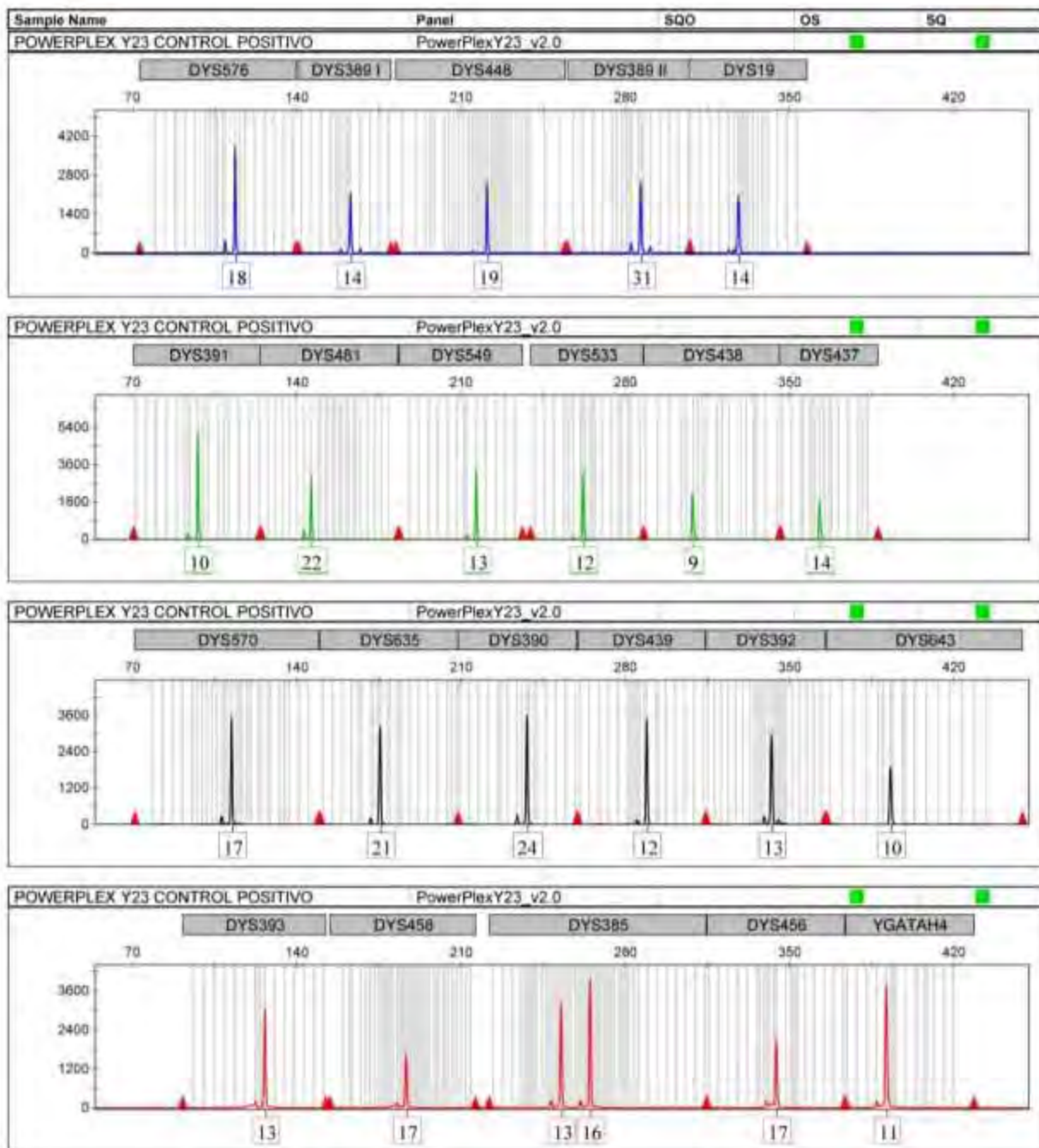


Gráfico 23. Electroferograma del control positivo de PowerPlex® Y23 System.

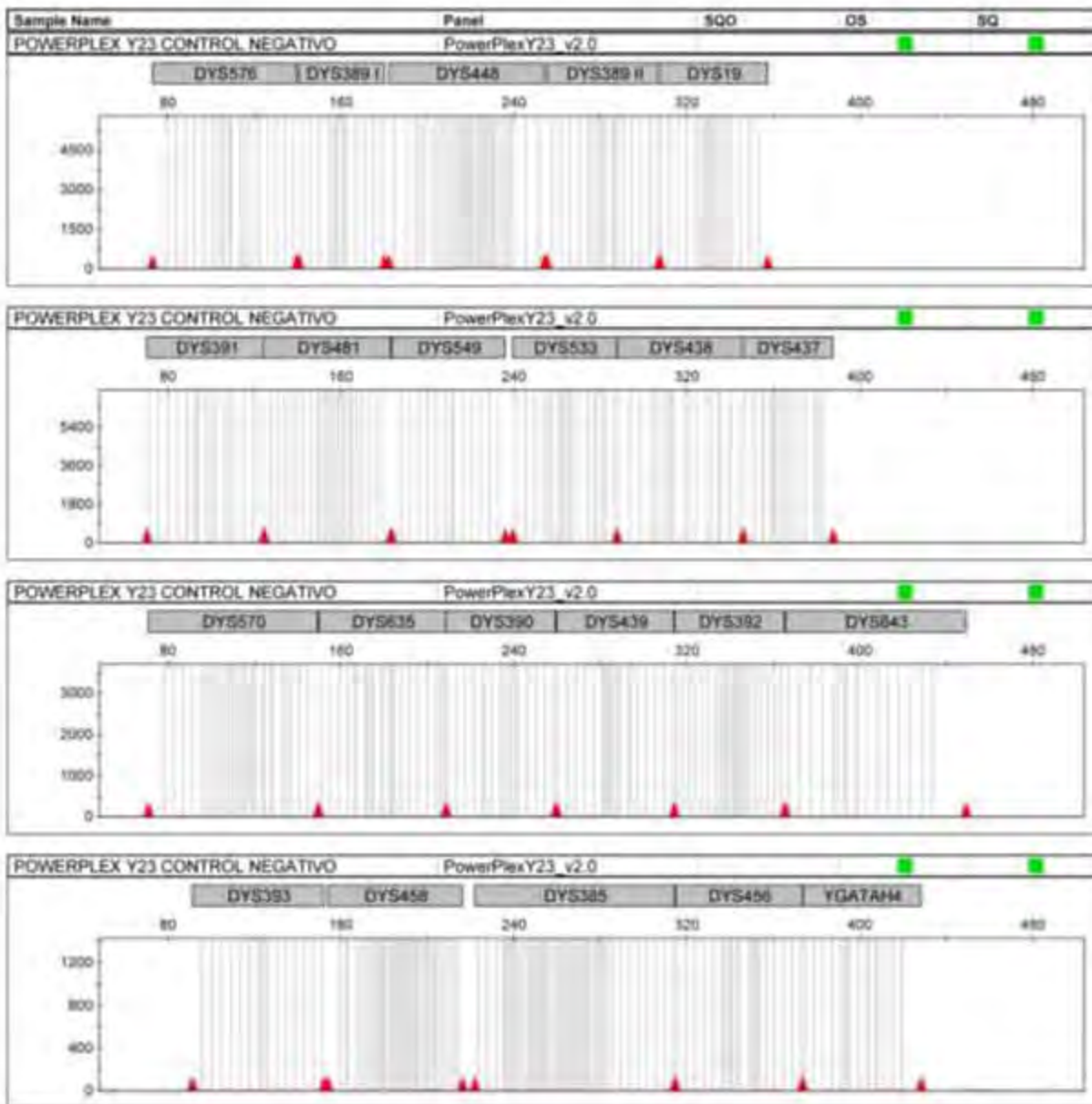


Gráfico 24. Electroferograma de blanco de reactivo sometido a Electroforesis Capilar durante la validación de PowerPlex® Y23 System.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Actualmente, muchos laboratorios en diferentes países han adoptado la norma ISO/IEC 17025 como base para establecer sistemas de calidad, en la cual se presentan formalmente los requerimientos para la acreditación y con esto reconocer la capacidad y competencia de los laboratorios. Convertirse en un laboratorio acreditado garantiza a los clientes que se cumple con los estándares internacionales y que el personal es técnicamente competente para realizar determinados tipos de pruebas e inspecciones. La norma ISO/IEC 17025:2017 incorpora requisitos relativos a la validación de métodos normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio, refiriéndose la validación como el proceso para demostrar que un procedimiento de laboratorio es robusto, confiable y reproducible y la verificación como la aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados.

Por lo que en este estudio se realizó la verificación de las pruebas de orientación ABACard® p30, ABACard HemaTrace® y SALIgAE® y la validación de los sistemas y procedimientos de extracción así como los métodos usados para el tratamiento de las muestras, purificación, amplificación y cuantificación y los equipos utilizados durante todo el proceso de análisis de ADN.

I. Verificación de las pruebas de orientación

Las pruebas de detección y confirmación disponibles para un laboratorio forense permiten examinar la evidencia de la presencia de fluidos corporales. Con la mayoría de las pruebas presentadas que involucran agresiones sexuales, es importante contar con pruebas confirmatorias para la identificación del semen que sean directas, rápidas y confiables. El propósito de este estudio fue verificar la sensibilidad y especificidad de la prueba ABACard® p30.

La verificación demostró que ABACard® p30 es altamente sensible para muestras de semen diluido, esto se correlaciona con otras investigaciones que encontraron alta sensibilidad en esta prueba.^(28, 67) Sin embargo, se puede observar que en muestras concentradas, se obtiene un resultado negativo, esto se debe a un exceso de antígeno a lo que se le conoce como efecto High Dose Hook (Figura 1c). ABACard® p30 mostró un resultado negativo o débilmente positivo en las diluciones 1:10000 y 1:100000 por una baja concentración de antígeno prostático, por

lo que las muestras de semen diluidas entre 1:10 y 1:8000 son óptimas para utilizar esta prueba (Gráfico 1), la sensibilidad de esta prueba dependerá de la concentración de antígeno de cada individuo y las condiciones de la muestra que comprometen la integridad de la misma. En esta verificación se estableció el corte en la dilución 1:8000, en la cual aún se observa un positivo no débil. En el estudio de especificidad se obtuvieron resultados negativos para sangre y semen, lo que indica que no hay reacción cruzada con antígenos que pueden contener estos fluidos (Tabla 1), siendo ABACard® p30 específico para el antígeno prostático. Sin embargo, es importante realizar el examen al microscopio de la muestra porque también se presentarán resultados positivos a plasma seminal no únicamente a semen.

La identificación forense de la sangre humana es una de las pruebas serológicas más importantes que se realizan. Los métodos convencionales de identificación consisten en una batería de pruebas, siendo la más importante la prueba confirmatoria la que indicará que se trata de sangre humana como lo es ABACard HemaTrace®.

Los resultados de las muestras de sangre diluidas indicaron que la prueba ABACard HemaTrace® es notablemente sensible.⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ Se observaron resultados positivos en la dilución 1:10, pero débilmente por el exceso de antígeno. Las diluciones donde se observó un resultado óptimo fueron de 1:100 a 1:1000. En la dilución 1:10000 se observó un resultado débilmente positivo pero en este caso por la disminución en la concentración de hemoglobina, siendo menor que 0.05 µg/mL⁽⁶⁸⁾, la concentración mínima detectada por la prueba según el fabricante (Gráfico 2). Por lo anterior el valor de corte establecido es en la dilución 1:1000. Cuando se realiza esta prueba es necesario trabajar con diluciones de la muestra de lo contrario no se observará ningún resultado, debido a la densidad de la sangre que no permite el corrimiento de esta a través de la placa (Figura 2c). Los resultados del estudio de especificidad donde se evaluaron muestras de semen y saliva, mostraron que no hay reacción cruzada con algún antígeno que contienen estas muestras comúnmente recibidas en el laboratorio (Tabla 2).

Las manchas de saliva pueden jugar un papel importante en la investigación forense de crímenes violentos. Una vez detectada, el ADN de una mancha de saliva puede remontarse a un individuo y proporcionar evidencia valiosa en su procesamiento, la prueba SALIgAE® ofrece una alternativa en la identificación de amilasa, en la cual se evaluaron la sensibilidad y especificidad.

En el estudio de sensibilidad en la prueba SALIgAE® se observó un resultado óptimo en las diluciones 1:10, 1:250 y 1:500, en las cuales se pudo hacer una lectura correcta por la intensidad de la coloración amarilla, sin embargo, en diluciones mayores, 1:1000 y 1:2000, la lectura se complica por la disminución de la intensidad de la coloración, por lo que es difícil de interpretar el resultado, por esta razón el corte se realizó en la dilución 1:500 (Gráfico 3), demostrando ser altamente sensibilidad ⁽²⁹⁾. La especificidad se evaluó únicamente con dos muestras de semen, las cuales resultaron ser negativas, indicando que la prueba SALIgAE® es específica para la identificación de la saliva (Tabla 3). En esta evaluación no se usaron muestras de sangre debido a que el color de estas influiría en la interpretación de la prueba.

II. Validación del método de extracción y purificación con el sistema Tissue and Hair Extraction Kit y DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16

Dentro del laboratorio también se requiere de un procedimiento de extracción y purificación de ADN del cual se obtenga ADN puro y suficiente para obtener un perfil genético. La automatización de este procedimiento de extracción de ADN disminuye el tiempo de intervención y reduce el riesgo de contaminación de la muestra, lo que también aumenta la calidad del perfil de ADN. Por lo que en este estudio se validó Tissue and Hair Extraction Kit como sistema de extracción de diferentes muestras: sangre, semen, pelo y saliva y purificadas con el sistema DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, utilizando el equipo mencionado.

La validación de la extracción y purificación se evaluó la reproducibilidad de cantidad y calidad de ADN, demostrando que existe variación en la concentración de ADN obtenido entre las ejecuciones realizadas en el equipo Maxwell® 16 para cada una de las muestras probadas (Tabla 4), sin embargo dicha cantidad de ADN fue suficiente para recuperar el 100% de los perfiles después de realizar la amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion, analizados con el umbral estocástico obtenido en esta validación de 314 RFUs (Gráfico 4), en el caso de las y observando en las diferentes ejecuciones en cada muestra genotipos constantes (Tabla 5). Es importante mencionar que a pesar de que se realizó la normalización de ADN con el equipo Biomek® 3000 a 0.5 ng de ADN por reacción, observamos perfiles con exceso de ADN al realizar la electroforesis, por lo que fue necesario realizar diluciones, esto quiere decir que el equipo no realiza la normalización de manera adecuada cuando se trabaja con muestras con concentraciones altas de ADN. Al realizar las diluciones del amplicón fue posible recuperar el

100% de los perfiles en el 80% de las muestras, en el caso de las muestras donde se recuperó menos del 100% del perfil se debe a que la dilución realizada fue mayor a la necesaria. En una muestra de sangre en una ejecución no se observaron alelos aunque se obtuvo ADN esto puede deberse a la inhibición de la PCR por la presencia de hemoglobina aunque no se observa inhibición en la cuantificación, a la presencia de sales o por el fotoblanqueamiento de los fluorocromos, en este tipo de situaciones se recomienda trabajar nuevamente la muestra.

Durante la evaluación de reproducibilidad se colocaron blancos de extracción que fueron purificados junto con las muestras, en los cuales no se detectó ADN mediante la cuantificación con el sistema Plexor® HY que pudiera deberse a la contaminación cruzada, esto fue comprobado en la amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion y sometidos a electroforesis donde los electroferogramas mostraron que no se generaron productos de la amplificación, observando únicamente ruido del sistema (Gráfico 5).

En la evaluación del rendimiento se detectaron niveles cuantificables de ADN casi en todas las muestras de sangre y semen extraídas (Tabla 6). Los resultados mostraron una relación lineal entre el volumen de la muestra y la concentración de ADN extraída observando mayor concentración de ADN en la dilución 1:50, menor en la dilución 1:500 y niveles no cuantificables en la dilución 1:500, sin embargo, esto es concordante debido a la baja cantidad de muestra. Demostrando con esto que es posible recuperar ADN de calidad a pesar de trabajar con muestras que contienen pequeñas cantidades de ADN usando la tecnología DNA IQ™ de sílice no porosa que tiene una alta capacidad de unión al ADN.

III. Validación del método de extracción con el protocolo Bone Incubation® Buffer y el tratamiento de muestras de hueso

Por otro lado, se validó el método de extracción de ADN de muestras de hueso con Bone Incubation® Buffer purificadas con el sistema DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, así como el método de preparación de dichas muestras, previo a la extracción de ADN que incluye la descalcificación, el laminado y micro lavado. La posibilidad de utilizar restos óseos como una fuente de ADN ha significado un importante impulso en la aplicación de las técnicas de Biología Molecular para múltiples fines forenses cuando no se cuenta con otro tipo de muestra.

El hueso, a diferencia de los tejidos conjuntivos, posee componentes extracelulares calcificados que hacen que sea un material duro, capaz de resistir en el tiempo más que el resto de los tejidos, excluyendo a los cabellos. Sin embargo, su descomposición ocurre

normalmente con una pérdida de la estructura integral, la exposición de las células internas y su consecuente degradación a nivel molecular. En el período post mortem la presencia y estabilidad del ADN en el hueso está determinada por diferentes factores, principalmente ambientales. Esto resulta de suma importancia puesto que la cantidad y calidad del ADN que pueda ser extraído de un hueso determina el potencial de las pruebas de Biología Molecular que se pueden aplicar al mismo.⁽⁷¹⁾

Como se mostró en este estudio a pesar de realizar un tratamiento previo a las muestras como los micro lavados para eliminar ADN exógeno y el uso de EDTA para la descalcificación de los huesos, sólo en algunos casos se logró la obtención de ADN suficiente para recuperar un perfil genético completo (Tabla 7), en algunos casos no se obtuvo ADN pero esto puede deberse a factores inherentes a la muestra. La recuperación de alelos STR fue considerable, obteniendo en perfiles completos y parciales en un 70% de las muestras (Gráfico 6), cuando se analizaron con el umbral estocástico obtenido en esta validación de 314 RFUs ya que se amplificaron con el sistema PowerPlex® Fusion. En el caso de las muestras en las cuales se obtuvieron perfiles parciales se recomienda que las muestras sean laminadas nuevamente con una mayor cantidad de éstas, digeridas con una menor cantidad de mezcla y eluidas con una menor cantidad de buffer, esto a consideración del analista.

IV. Validación del uso de papel FTA® para muestras de referencia y lavado del papel

Otro procedimiento de extracción de ADN es la que se realiza con papel FTA. Recientemente se ha difundido el uso de este producto puesto que mantiene la estabilidad de la muestra por períodos prolongados, además de que para la obtención de un perfil incluye menos pasos, lo que reduce el costo y el tiempo de práctica en el laboratorio. Por esta razón, el papel FTA se utiliza con frecuencia para investigaciones de Genética Forense para la toma de muestras de referencia. Los pasos a seguir para obtener un perfil usando una muestra colocada en papel FTA, son: la perforación del papel para obtener fragmentos de 1.2 mm, lavado del papel, en algunos casos, la amplificación y por último la electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR. Por lo que en este estudio se validó el método de lavado utilizado en el laboratorio, cuyo propósito es eliminar los inhibidores que pudieran estar presentes en la muestra que afectaran la amplificación principalmente la hemoglobina. Los laboratorios comúnmente reducen el

volumen de reacción para ahorrar costos, para la validación en el laboratorio se redujo el volumen de 25 µL de mezcla de reacción a 15 µL y amplificando a 26 ciclos para cada uno de los sistemas.

En la amplificación muestras de sangre en papel FTA con el sistema PowerPlex® Fusion no fue necesario realizar los lavados previos, obteniendo perfiles completos en todas las muestras, indicando que el sistema presenta una alta tolerancia a los inhibidores como la hemoglobina presente en las muestras (Gráfico 7). El lavado se realizó para amplificar con el sistema PowerPlex® Y23, obteniendo perfiles completos en todas las muestras (Gráfico 10), indicando con esto que el lavado es óptimo para este tipo de muestras, de no realizar el lavado se recomienda trabajar con la reacción completa de amplificación.

También observando que en el uso de ambos sistemas se obtuvieron perfiles con un promedio de altura de alelos superaron los 300 RFUs y están por debajo de 5000 RFUs (Gráfico 7 y 9) cuyos valores indican que se encuentran por arriba del umbral estocástico para indicios y por debajo del límite de linealidad recomendados para el análisis de perfiles genéticos,^(72, 73) alcanzando una altura de alelos mínima de 552 RFUs y máxima de 4547 RFUs para el sistema PowerPlex® Y23 y una altura de alelos mínima de 381 RFUs y máxima de 3072 RFUs para PowerPlex Fusion®. Sólo en el caso del sistema PowerPlex® Fusion, se realizaron diluciones de las muestras 9 y 10, puesto que se observaron pull-ups, por la alta concentración de ADN la dilución fue de 1:10 y con esto se obtuvieron perfiles completos e interpretables (Gráfico 8).

Así demostrando que a pesar de la variabilidad de leucocitos presentes en la muestra de sangre en papel FTA se obtuvieron perfiles completos si se trabajan a 26 ciclos en los dos sistemas, siempre y cuando los fragmentos de papel FTA amplificados con el sistema PowerPlex® Y23 sean lavados previamente.

V. Validación del método de cuantificación con el sistema Plexor® HY System y los equipos Biomek® 300 y Stratagene MX3005P®

La cuantificación del ADN de una muestra dada es un paso extremadamente importante en los laboratorios forenses, ya que permite determinar no sólo la concentración aproximada de ADN presente en una muestra dada sino también su calidad, y así seleccionar el método de amplificación más adecuado para ser utilizado. Por lo tanto, conocer el volumen óptimo de ADN requerido para la ejecución permite ahorrar tiempo y recursos financieros.

Uno de los principales objetivos del presente estudio fue la validación interna del método de cuantificación con el sistema Plexor® HY, un sistema de cuantificación autosómica y masculina, donde se evaluaron reproducibilidad y sensibilidad.⁽⁵⁸⁾

En este estudio se comparó la reproducibilidad intra e inter placas en el equipo de cuantificación Stratagene MX3005P®. Se prepararon diluciones de ADN estándar a concentración alta (~10 ng/μL), moderada (~ 0.4 ng/μL) y baja (~ 0.016 ng/μL) con el equipo Biomek® 3000 y se cuantificaron cinco veces durante tres ejecuciones independientes. Se observó una gran variación dentro de la placa demostrado con el coeficiente de variación (CV), por ejemplo en la placa que va de 11 a 33%, sin embargo, mostrando una mejora en la última corrida con un coeficiente de variación del 17 al 19%. La variación intra placas fue más alta en la cuantificación de la concentración moderada y baja de ADN pero el conjunto de resultados de cuantificación fueron adecuados, si consideramos que las cantidades de ADN cuantificadas son tan bajas. Aunque en la concentración más alta podemos observar que la variación inter placas es similar con un intervalo del 11 al 17%, esto con respecto a los datos de ADN autosómico. En los resultados de cuantificación de cromosoma Y, podemos observar que el CV indica una gran diferencia entre las mediciones obtenidas entre intra e inter placas, a pesar de diferencia en la segunda corrida en la concentración menor se obtuvo un CV del 6%, indicando que la concentración no determina la variación en la mediación (Tabla 8).

Por último, se evaluó la sensibilidad utilizando muestras masculinas, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del sistema para medir cantidades de ADN muy bajas y determinar la cantidad de ADN molde por debajo del cual no se espera que la amplificación produjera un perfil de ADN. Se probó el sistema con diferentes cantidades de ~0.120 ng a ~0.0014 ng del ADN genómico masculino. Observando que la cuantificación fue exitosa hasta cantidades menores que las reportadas por Promega, que es de 0.0064 ng⁽⁷⁴⁾ pero al amplificar con el sistema PowerPlex® Fusion se obtuvieron perfiles parciales incluso cuando se usó una cantidad de ADN de 0.131 ng y en cantidades menores simplemente no fue posible recuperar ningún alelo (Gráfico 12), ya que la concentración es tan baja que incluso ni en la amplificación de la cantidad de 0.131 ng que contiene la mayor concentración de ADN, no se pudo observar una altura de alelos promedio superior al umbral estocástico de 314 RFUs (Gráfico 11), por lo que no se recomienda trabajar con cantidades tan bajas como las utilizadas en este estudio.

VI. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Fusion

La determinación del perfil genético de marcadores autosómicos de un individuo en una muestra determinada es el propósito de la Genética Forense, en una investigación criminal, en la identificación de personas desaparecidas o en estudios de paternidad. Para esto, los métodos de amplificación del ADN extraído de estas muestras es un paso crucial dentro de todo este proceso. La validación interna del sistema PowerPlex® Fusion permitió su uso correcto en la rutina de laboratorio para el análisis y para eso se evaluó su sensibilidad y con estos resultados se calculó la cantidad óptima de ADN, límite de detección, umbral analítico, estocástico, el porcentaje *stutter*, límite de linealidad, además de evaluar la precisión, reproducibilidad, repetibilidad y contaminación.

Para evaluar la sensibilidad se utilizó ADN extraído de dos muestras de sangre masculinas. Usando cantidades finales de ~1.0ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng and 0.0312 ng de ADN las cuales se amplificaron por triplicado a 30 ciclos. La detección de la muestra se realizó en un ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. Las cantidades de ADN de 1 y 0.5 ng permitieron la asignación del 100% de los alelos esperados (Gráfico 14). A 0.25, 0.125 y 0.0625 ng, el porcentaje de alelos recuperados disminuyó ligeramente de forma gradual. Cuando se trabajó con 1 ng de ADN se observaron pull-ups, por lo que no es recomendable trabajar con esta concentración. El promedio de las alturas de los alelos en esta concentración superó el umbral estocástico de 314 RFUs, observando en las siguientes cantidades una disminución en la altura de los alelos de manera proporcional a la cantidad de ADN (Gráfico 13), estableciendo la cantidad óptima para usar este sistema con 0.5 ng (Tabla 9), que se encuentra del intervalo recomendado que va de 0.1 a 0.5 ng de ADN.⁽⁷⁵⁾

El umbral analítico calculado fue de 41 RFUs, obteniendo un valor como es recomendado en varias publicaciones el cual va de 25 a 50 RFUs. Posteriormente se calculó el umbral estocástico, calculado a partir de 0.0635 ng, puesto que en esta cantidad se observaron homocigóticos falsos, es decir, heterocigóticos donde un alelo caía por debajo del umbral analítico previamente calculado el cual fue de 314 RFUs que se encuentra ligeramente por encima del recomendado que va de 150 a 300 RFUs, estos dos parámetros se calcularon un nivel de confianza del 100%, y en esta misma concentración se calculó el límite de detección obteniendo un valor de 17 RFUs (Tabla 9).⁽⁷²⁾

Algunas veces aparecen *stutter*, estos son productos de una o más unidades de repetición más cortas o más grandes que la longitud de secuencia verdadera producidos por la ADN polimerasa durante la amplificación, la aparición de picos *stutter* no suele generar problemas interpretativos en perfiles únicos, sin embargo, sí que lo es en la interpretación de perfiles de mezclas, por lo que es importante obtener los valores de estos artefactos para poder realizar un análisis correcto. Estos picos llamados *stutters* no deben superar los valores obtenidos en la validación (Tabla 9.1) a partir de los datos de sensibilidad cuando se trabaja con muestras de fuente única en caso de superarlo se podría sospechar de una mezcla pero es importante observar más características en el electroferograma analizado. En este estudio se realizó este cálculo con los datos obtenidos en la cantidad de 0.5 ng, puesto que fue considerada como la cantidad óptima para trabajar dentro del laboratorio. Los porcentajes *stutters* obtenidos no muestran una relación entre el número de nucleótidos del marcador ni el tamaño de estos en los cuales se debe tener un mayor porcentaje entre menor sea el número de repetición, además se puede observar que en el trinucleótido muestra un tres por ciento, que en los tetranucleótidos el porcentaje *stutter* va del dos al 12% aproximadamente y por último los pentanucleótidos que son los que marcan los marcadores que deberían presentar un porcentaje de al menos dos por ciento como en el caso del marcador Penta D, pero en el marcador Penta E no muestra este comportamiento, obteniendo un valor de 6 por ciento. Sin embargo, todos los porcentajes obtenidos se encuentran por debajo del 15%.⁽³⁾

Otro parámetro obtenido del estudio de sensibilidad de este sistema de amplificación, es el límite de linealidad, el cual se obtiene a partir de graficar la cantidad de ADN contra la altura de los alelos obtenidos en RFUs (Gráfico 15), donde se muestra que en todos los canales que existe linealidad hasta cuando se usa 1 ng de ADN, de tal manera no se puede saber en qué punto se pierde la linealidad.

La recuperación de los alelos depende de una migración similar entre la muestra y el estándar de escalera alélica. Por lo tanto, la migración debe ser consistente y encontrarse dentro del rango de los bins para que la asignación de los alelos sea precisa, por lo que en este estudio se abordó las fuentes típicas de variabilidad, como las diferencias entre los capilares y las inyecciones. Para demostrar la precisión, se detectaron escaleras alélicas en un ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer, calculando la desviación estándar en el tamaño para cada alelo. Tres veces la desviación estándar máxima de un alelo fue de 0.27 pb (Gráfico 16), y en ningún caso se superó 0.5 pb, demostrando que no hay gran variabilidad con este sistema al realizar

la electroforesis, demostrando ser preciso. La desviación estándar máxima fue observada alelos más grandes, es decir, la variabilidad del tamaño aumentó con el tamaño del alelo, como fue en el caso de los loci Penta D, Penta E, TPOX, DYS391, FGA y D22S1045.

Para el estudio de exactitud se procedió al análisis del perfil genético obtenido del control positivo que contiene el sistema PowerPlex® Fusion, obteniendo el mismo perfil si se compararon con la referencia reportada por el Promega (Tabla 10).⁽⁵²⁾ Además, fue posible observar una recuperación de alelos del 100% para todas las veces que se amplificó y sometió a electroforesis (Gráfico 17), ya que todos los alelos superaron el umbral estocástico previamente establecido (314 RFUs), demostrando con este estudio que los resultados obtenidos son consistentes con otros laboratorios cuando cualquier analista trabaja una muestra de manera independiente.

Para garantizar que el proceso del manejo de muestras en el laboratorio no hubo contaminación para detectar la presencia de ADN exógeno, se evaluaron controles negativos los cuales consistieron en amplificar la mezcla de reacción del sistema PowerPlex® Fusion sin ADN y que fueron sometidos a electroforesis. Los resultados arrojados (Gráfico 18), muestran que no se presente ADN que pudiera provenir de la amplificación, de otros pozos, del personal o del secuenciador.

VII. Validación del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Y23

El análisis STR-Y es una herramienta necesaria en el trabajo forense, particularmente en casos de agresión sexual y homicidio, cuando no se obtienen perfiles autosómicos probatorios pero se detecta un componente masculino. Además, el análisis STR-Y puede respaldar aún más las mezclas autosómicas que tienen un rastro de contribución masculina. Como el análisis STR-Y se dirige específicamente al ADN masculino, es extremadamente útil para el análisis de muestras íntimas que tienen una gran cantidad de ADN femenino en relación con la cantidad de ADN masculino. Además, debido a la naturaleza altamente sensible del análisis STR-Y, tiene una gran utilidad en el análisis en casos en los que la cantidad de ADN obtenida puede no ser suficiente para el análisis autosómico de STR⁽⁷⁶⁾ como lo es el sistema PowerPlex® Fusion. Por lo que en la validación de este sistema se evaluó sensibilidad, obteniendo de igual manera límite de detección, umbral analítico, cantidad óptima de ADN, el límite de linealidad, porcentaje *stutter*, y la evaluación de la precisión, reproducibilidad y contaminación.

Para evaluar la sensibilidad del sistema PowerPlex® Y23 se utilizaron tres muestras de sangre masculinas, obteniendo las siguientes cantidades de ADN: ~1.0ng, 0.50 ng, 0.250 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng y 0.0312 ng y se amplificaron por triplicado a 30 ciclos. La detección de la muestra se realizó en un ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer.

La recuperación de perfiles del 100% se observó en 1.0 ng, 0.50 ng, 0.250 ng de ADN y menores al 100% en 0.125, 0.0625 y 0.0312 ng (Gráfico 20). En todas las cantidades analizadas se muestra que el promedio de la altura de los picos obtenidos supera el umbral analítico calculado en esta validación de 44 RFUs. Sin embargo, en la cantidad de 1.0 ng de ADN se observaron pull-ups por la alta concentración de ADN, por lo que las cantidades óptimas que serán utilizadas en el laboratorio será entre 0.25-0.50 ng, proporcionando el mejor equilibrio entre la altura de los alelos y con la menor cantidad de artefactos, encontrándose dentro del intervalo recomendado de entre 0.1 y 0.5 ng de ADN.⁽⁷⁶⁾ Se utilizaron los datos de ambas cantidades para el cálculo de límite de detección y el umbral analítico. Además de que no es recomendable trabajar con concentración debajo de 0.25 ng, ya que cuando se trabaja con muestra con bajas cantidades de ADN se pueden producir efectos estocásticos.

Para el cálculo de los límites de detección se utilizaron tres desviaciones estándar arriba del promedio, indicando este valor que todo lo que esté por debajo de este valor será ruido, los valores obtenidos fueron de 15 y 19 RFUs para 0.5 ng y 0.25 ng de ADN, respectivamente. El umbral analítico obtenido de diez desviaciones estándar con un nivel de confianza del 100%, propuesto por el laboratorio, los cuales fueron de 36 y 44 RFUs para dichas cantidades (Tabla 11), encontrándose dentro del intervalo de los valores recomendados para el análisis de los electroferogramas que es del 25 a 50 RFUs.⁽⁷²⁾

Por otro lado, se calculó el porcentaje *stutter* a partir de los datos del estudio de sensibilidad para cada marcador (Tabla 11.1), los valores obtenidos de los marcadores de tetranucleótidos muestran porcentajes del dos al 21% esto cuando se trabaja con 0.25 y 0.5 ng de ADN, superando el 15% recomendado⁽³⁾, y mostrando porcentajes menores en el marcador trinucleótido en ambas cantidades. Por último, el límite de linealidad que se obtiene a partir de graficar la cantidad de ADN y la altura promedio de los alelos en RFUs no se pudo determinar, ya que se observa linealidad incluso cuando se utiliza 1.0 ng de ADN (Gráfico 21).

El centro de la tipificación de polimorfismos de longitud se define en la precisión de las mediciones basadas en la migración durante la electroforesis. Para evaluar la consistencia del tamaño del fragmento para el sistema PowerPlex® Y23, se analizó 10 veces la escalera alélica de este sistema en el ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. Se calculó el tamaño promedio para cada locus y la desviación estándar, de la cual se graficó el tamaño promedio contra tres veces la desviación estándar, en donde se observa que no se superó 0.5 pb, siendo el valor máximo observado de 0.47 (Gráfico 22), por lo que el sistema PowerPlex® Y23 demostró tener un alto grado de precisión.

En el estudio de reproducibilidad, al amplificar el control positivo del sistema se observó que en cada réplica los controles positivos produjeron el perfil de ADN esperado y completo⁽⁵⁴⁾, lo que demuestra que el sistema es reproducible (Tabla 12), con promedios de altura de alelos que superan el umbral analítico de 44 RFUs (Gráfico 23). Los controles se amplificaron junto con las muestras y se descubrió que estaban libres de contaminantes (Gráfico 24).

CONCLUSIONES

- En este estudio se validaron todos los procedimientos utilizados para el análisis de ADN en el laboratorio de Genética Forense, LORGEN MÉXICO S.A. de C.V., para esto se desarrollaron protocolos de validación, con ayuda de algunas guías y manuales provistos por Promega, los cuales fueron extendidos y adaptados de acuerdo a los recursos con los que contaba el laboratorio, logrando así satisfactoriamente la aplicación de cada uno de ellos.
- Las tres pruebas de orientación ABACard® p30, ABACard Hematrace®, y SALIgAE® verificadas en este estudio mostraron una alta sensibilidad. Se observó un alto grado de especificidad para las tres pruebas cuando fueron confrontadas con otros fluidos corporales. Por estas razones, las tres pruebas son de gran utilidad para el tipo de muestras que se trabajan en el laboratorio, además de que son fáciles de realizar, leer e interpretar.
- Los métodos de extracción evaluados en este estudio fueron Tissue and Hair® Extraction Kit, Bone Incubation® Buffer, demostrando que la extracción mediante estos sistemas fue exitosa, obteniendo la cantidad de ADN suficiente para tener un perfil genético completo o parcial, siendo de gran ayuda en la extracción de muestras como sangre, semen, saliva, pelo con folículo y huesos, siempre y cuando el manejo de estas muestras se lleve de manera correcta y los huesos lleven un tratamiento previo, que aumenta de manera exitosa la obtención de ADN.
- El método de purificación con el sistema DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 se evaluó según lo recomendado por las pautas de validación actuales. Los resultados muestran que el método es capaz de producir extractos reproducibles de ADN de calidad, con un alto rendimiento y pureza partir de una variedad de muestras, concluyendo también que el Instrumento Maxwell® 16 es adecuado para su uso dentro del laboratorio.
- El uso de papel FTA para la amplificación de muestras de sangre como muestras de referencia, mostraron que son de gran utilidad cuando se utilizan ambos sistemas de amplificación de STRs. Al amplificar con los sistemas PowerPlex® Fusion y PowerPlex® Y23 se producen perfiles completos, siempre y cuando se realicen lavados previos a la amplificación de las muestras de sangre en papel FTA cuando se usa el sistema PowerPlex®

Y23. Observando en ambos casos que al trabajar con una menor cantidad de mezcla de reacción que la recomendada por el fabricante no afectó de manera negativa la amplificación, por lo que son adecuados dentro del laboratorio para optimizar el tiempo y el uso de reactivos.

- El método de cuantificación utilizando el sistema Plexor® HY se validó en este estudio evaluando la reproducibilidad y sensibilidad de este, con el equipo Stratagene MX3005P®, los resultados los demostraron que es confiable y robusto, pues proporciona datos de cuantificación de ADN autosómico y de cromosoma Y, sugiriendo una cantidad apropiada de muestra para producir resultados STR interpretables, siendo funcional dentro del laboratorio.
- El método de amplificación utilizando el sistema PowerPlex® Fusion se desarrolló para la identificación humana mediante el análisis STR para la identificación humana para muestras de casos y referencias. Siguiendo las pautas de validación de SWGDAM, el laboratorio demostró un desempeño sólido en todas las pruebas de validación del sistema PowerPlex® Fusion. Los resultados de validación verifican que el sistema PowerPlex® Fusion es un múltiplex de tipificación STR robusto y confiable adecuado para la identificación humana.
- Los resultados de este estudio demuestran la confiabilidad y la robustez del método de amplificación con el sistema PowerPlex® Y23, siendo este una gran herramienta para obtener haplotipos a partir muestras forenses de ADN de muestras masculinas.
- El equipo Biomek® 3000, aumenta el rendimiento y la eficiencia de los procesos de laboratorio para mantenerse al día en las solicitudes de análisis, por lo que es de gran utilidad en el laboratorio para la cuantificación y normalización de ADN.
- Después de conocer todos los procesos utilizados en el análisis de ADN en el laboratorio de Genética Forense y ser validados, será posible aplicarlos de manera adecuada a diferentes tipos de muestras, tanto de indicios como referencias, y al obtener los resultados de los perfiles genéticos estos podrán ser analizados de forma correcta, ya que en la validación obtuvimos los parámetros necesarios para poder realizarlo y con esto poder asegurar la calidad de todos los resultados obtenidos dentro del laboratorio. Además de que al realizar la validación se cuenta con uno de los requisitos necesarios para que el laboratorio sea acreditado.

ANEXO A

Protocolo de amplificación para PowerPlex® Fusion System

- Ajustar a 96°C por 1 minuto para la activación enzimática,
 - Someter a n ciclos:
 - desnaturalización a 94°C por 10 segundos,
 - alineación a 59°C por 1 minuto,
 - y extensión a 72°C por 30 segundos.
 - Una extensión de 60°C por 20 minutos,
 - Finalmente, una incubación sostenida de 4°C
-

Protocolo de amplificación para PowerPlex® Y23 System

- Ajustar a 96°C por 2 minutos para la activación enzimática,
 - Someter a n ciclos:
 - desnaturalización a 94°C por 10 segundos,
 - alineación a 61°C por 1 minuto,
 - y extensión a 72°C por 30 segundos.
 - Una extensión de 60°C por 20 minutos,
 - Finalmente, una incubación sostenida de 4°C
-

ANEXO B

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



Municipio Libre 366 P1 y 2
Col. Sta. Cruz Atoyac
Del. Benito Juárez
México D.F. C. P. 03310
Tels. 56054987 y 56013004 exts. 19 y 20

FCC-58

_____ a _____ de _____ de _____

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL DONANTE

NOMBRE: _____

SEXO:

MASCULINO ☐

FEMENINO ☐

FECHA DE NACIMIENTO: _____

LUGAR DE NACIMIENTO: _____

DOMICILIO ACTUAL: _____

TELÉFONO: _____

TIPO DE IDENTIFICACIÓN QUE PRESENTA:

CREDENCIAL DE ELECTOR ☐

LICENCIA PARA CONDUCIR ☐

CARTILLA SMN ☐

PASAPORTE ☐ OTRA ☐ DESCRIBIR _____

¿Ha recibido transfusión sanguínea o trasplante de médula ósea en el último año?:
_____.

- ❖ MANIFIESTO QUE DONO DE MANERA VOLUNTARIA MUESTRA BIOLÓGICA, A FIN DE QUE SE REALICEN LOS ESTUDIOS GENÉTICOS. SI ☐ NO ☐
- ❖ AUTORIZO LA UTILIZACIÓN DE MI PERFIL GENÉTICO, DESLIGADO DE MIS DATOS PERSONALES (NOMBRE Y OTROS DATOS INDIVIDUALIZANTES), COMO INFORMACIÓN ANÓNIMA EN ESTUDIOS GENÉTICOS-POBLACIONALES. SI ☐ NO ☐
- ❖ HE SIDO TAMBIÉN INFORMADO/A DE QUE MIS DATOS PERSONALES SERÁN PROTEGIDOS Y NO SE UTILIZARÁN CON NINGÚN OTRO FIN QUE NO SEA EL DE LA INVESTIGACIÓN, ANTES MENCIONADA.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL DONANTE

REFERENCIAS

1. García O, Alonso A. Las bases de datos de perfiles de ADN como instrumento en la investigación policial. España: Editorial Comares; 2002. 27-44 p.
2. Carracedo A, Salas A, Lareu MV. Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. Cuadernos de Medicina Forense. 2010;16:31-5.
3. Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2 ed. New York: Elsevier 2005.
4. Carracedo A. ADN: la genética forense y sus aplicaciones en investigación criminal [Internet]. España: Universidad de Santiago de Compostela; [cited 17 Enero 2018]. Available from: http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/2013/PONENCIAS/Junio/1559347945_1062013_102130.pdf.
5. Cal M. Análisis de polimorfismos de ADN microsatélite de cromosoma Y. Estudio de la población de Galicia y aplicaciones forenses. [Doctorado]. España: Universidad de Santiago de Compostela; 2001.
6. Laboratorios Forenses [Internet]. México: Entidad mexicana de acreditación; 2017 [cited 10 Junio 2018]. Available from: http://www.ema.org.mx/portal_v3/index.php/folleto-laboratorios-forenses.
7. ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración Suiza: Secretaría Central de ISO; [cited 24 Junio 2017].
8. Farfán J. Recomendaciones y guías internacionales sobre el análisis e interpretación de perfiles mezcla [Internet]. España: GEP- ISFG 2013 [cited 09 Junio 2018]. Available from: http://www.gep-isfg.org/archivos/201310/GHEP2013_Sevilla_Recomendaciones_Guias_Mezclas.pdf?1.
9. Vega ML. Frecuencias alélicas de 20 loci autosómicos que exhiben polimorfismo de inserción de elementos retrotransponibles (INNULs) en la población del Valle de México [Doctorado]. México: Instituto de Ciencias Jurídicas de Nayarit; 2018.
10. Carracedo A. Conceptos básicos de ADN forense [Internet]. España: Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses; 2004 [cited 6 Septiembre 2017]. Available from: <http://181.189.159.2/a2015/julio/forenses/contenido/ponencias/Antonio%20Alonso/Conceptos%20basicos%20de%20ADN%20forense.pdf>.
11. Demostrar comprensión de ideas biológicas relacionadas con la variación genética [Internet]. Nueva Zelanda: PassBiology; 2017 [cited 10 Junio 2018]. Available from: <http://www.passbiology.co.nz/biology-level-1/genetics-science-1-9>.
12. Klug WS, Cummings MR. Conceptos de genética: Prentice Hall; 1998.
13. Lorente JA, Acosta JAL. Un Detective llamado ADNA: tras las huellas de criminales, desaparecidos y personajes históricos: Temas de Hoy; 2004.
14. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo PM, Valdespino-Castillo VE. Organización estructural y funcional del genoma humano: variación en el número de copias predisponentes de enfermedades degenerativas. Gaceta Mexicana de Oncología. 2013;12(6):426-32.
15. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics. Englad: Wiley & Sons; 2011.
16. Ramírez E. Análisis Genético de 22 Loci STR en la Población de la Ciudad de México [Licenciatura]. México: UNAM; 2014.
17. Lorente JA, Vega ML, Rosas GO. Genética Forense: la Ciencia al Servicio de la Justicia. Mensaje Bioquímico. 2007;31:44-67.
18. Rodríguez C, Rodarte B, Monter M, Coss A, Castañeda A, Rodríguez R. Genética forense. Revista Fuente. 2010;2(4).
19. C J. Pruebas Químicas de Saliva en la Detección de Amilasa Salival en la Investigación de un Delito [Licenciatura]. México: UNAM: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2014.
20. An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. BMB reports. 2012;45(10):545-53.

21. Castro DM, Coyle HM. Biological Evidence Collection and Forensic Blood Identification [Internet]. USA: College of Criminal Justice & Forensic Science; 2011 [cited 26 Mayo 2018]. Available from: http://www.identacode.org/Castro_Review_Biological_Evidence_2011.pdf.
22. Fox S. Fisiología humana. 12 ed. USA: McGraw Hill; 2011.
23. BloodPrep™ Chemistry: DNA Isolation from Whole Blood, Tissue-Cultured Cells, Buccal Swabs, and Other Materials [Internet]. USA: Applied Biosystems; 2003 [cited 02 Octubre 2018]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Warranties/cms_040195.pdf.
24. ABACard® HemaTrace® Test for the Identification of Human Hemoglobin [Internet]. USA: President's DNA Initiative; 2008 [cited 27 Mayo 2018]. Available from: https://static.training.nij.gov/lab-manual/Linked%20Documents/Protocols/pdi_lab_pro_2.20.pdf.
25. Johnston S, Newman J, Frappier R. Validation Study of the Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace® Membrane Test for the Forensic Identification of Human Blood. Canadian Society of Forensic Science Journal. 2003;36(3):173-83.
26. Tadeo M. La genética forense en México su aplicación legal y el banco de datos Genéticos [Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
27. Noriega L. El ADN de Locard: Genética forense y criminalista. España: Reus; 2013.
28. Cooper P, Spruce C, Webb L, Borowitzka A. A comparison of the ABACard® p30 and Rapid Stain Identification (RSID®) – Semen test kits. [Internet]. PathWest Forensic Biology Department; [cited 5 Febrero 2018]. Available from: http://www.seiddon.com/Semen_archivo_1.pdf.
29. Kristaly BaS, D. Validation of the OneStep ABACard PSA test for the rapid forensic identification of semen. [Internet]. USA: Abacus Diagnostics; [cited 27 Mayo 2018]. Available from: http://www.abacusdiagnostics.com/ABACardp30/4_ABACard_p30_Semen_Miami_Dade_Police_Adriana_Kristaly_David_Smith.pdf.
30. Zalba J. La saliva: fuente de salud para la boca [Internet]. España: Centro avanzado en prevención; 2010 [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: https://capdental.net/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/37_1_1_LA_SALIVA_FUENTE_DE_SALUD.PDF.
31. Miller D, Hodges J. Validation of Abacus SALIgAE® Test for the Forensic Identification of Saliva [Internet]. USA: State Police Forensic Laboratory; 2005 [cited 27 Mayo 2018]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/4362/b9f046cf783757e72b22b4e1dd8e3108c06a.pdf>.
32. Arellano I, Bastidas E. Estudio de la amilasa como aporte en la investigación en personas víctimas de agresión sexual que se llevará a cabo en el centro de investigación de ciencias forenses en la Ciudad de Ambato en el periodo de Noviembre 2015- Abril 2016 [Licenciatura]. Ecuador: Universidad Nacional de Chimborazo; 2016.
33. Saliva Identification Test [Internet]. USA: Abacus Diagnostics; 2011 [cited 12 Junio 2018]. Available from: <https://www.abacusdiagnostics.com/saliva.htm>.
34. Butler JM. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. USA: Elsevier; 2011.
35. Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™) Technical Bulletin [Internet]. USA: Promega; 2016 [cited 11 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/tissue-and-hair-extraction-kit-for-use-with-dna-iq-protocol/>.
36. Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™) [Internet]. USA: Promega; 2016 [cited 11 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/tissue-and-hair-extraction-kit-for-use-with-dna-iq-protocol.pdf>.
37. Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ) [Internet]. USA: MyBio; 2018 [cited 11 Junio 2018]. Available from: <https://mybio.ie/products/promega-1765>.
38. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. Forensic science international Genetics. 2007;1(2):191-5.
39. Bone Extraction Protocol to be Used With the DNA IQ™ System [Internet]. USA: Promega; 2008 [cited 12 Junio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/boneprotocol.pdf?la=en>.

40. Krnajski Z, Geering S, Steadman S. Performance verification of the Maxwell 16 Instrument and DNA IQ Reference Sample Kit for automated DNA extraction of known reference samples. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 2007;3(4):264-9.
41. Maxwell® 16 DNA Purification Kits Technical Manual [Internet]. USA: Promega; 2017 [cited 12 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/maxwell-16-dna-purification-kits-protocol/>.
42. DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 [Internet]. USA: Promega; 2016 [cited 12 Junio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/dna-iq-casework-pro-kit-for-maxwell-16-protocol.pdf>.
43. Maxwell® 16 System [Internet]. USA: Promega; 2012 [cited 12 Junio 2018]. Available from: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Promega_Biotecnologia_Iberica_1.pdf.
44. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2013;2(2):70-8.
45. Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems [Internet]. USA: Promega; 2017 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/plexor-hy-system-for-the-applied-biosystems-7500-and-7500-fast-real-time-pcr-systems-protocol.pdf?la=en>.
46. Krenke BE, Nassif N, Sprecher CJ, Knox C, Schwandt M, Storts DR. Developmental validation of a real-time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA. *Forensic science international Genetics*. 2008;3(1):14-21.
47. Stangegaard M, Meijer PJ, Borsting C, Hansen AJ, Morling N. Biomek 3000: the workhorse in an automated accredited forensic genetic laboratory. *Journal of laboratory automation*. 2012;17(5):378-86.
48. Beckman Coulter Human ID Solutions [Internet]. Promega; 2010 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/conference-proceedings/ishi-20/poster-abstracts/poster82.pdf?la=en>.
49. Second Beckman Coulter Biomek® Platform Awarded Premier Application Status by Affymetrix [Internet]. USA: Business Wire; 2007 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20070912005390/en/Beckman-Coulter-Biomek-Platform-Awarded-Premier-Applicatio>.
50. MxPro QPCR Software for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems [Internet]. USA: Agilent Technologies; 2009 [cited 25 Junio 2018]. Available from: http://users.stlcc.edu/Departments/fvbio/Thermal_Cycler_MxPro_Manual.pdf.
51. Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems Setup and User's Guide [Internet]. USA: Agilent Technologies; 2015 [cited 25 Junio 2018]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/70225.pdf>.
52. PowerPlex® Fusion System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers [Internet]. USA: Promega; 2017 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-system-protocol.pdf>.
53. PowerPlex® Fusion System [Internet]. USA: Promega; 2018 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/genetic-identity-workflow/str-amplification/powerplex-fusion-system/?catNum=DC2402>.
54. PowerPlex® Y23 System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers [Internet]. USA: Promega; 2017 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-y23-system-protocol.pdf>.
55. PowerPlex® Y23 System [Internet]. USA: Promega; 2018 [cited 24 Junio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/genetic-identity-workflow/str-amplification/powerplex-y23-system/?catNum=DC2305>.
56. 3100 Genetic Analyzer [Internet]. USA: Thermo Fisher Scientific; 2015 [cited 29 Junio 2018]. Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/313001R>.
57. Cruz JH. Análisis genético poblacional de la Ciudad de México utilizando 20 loci STR [Licenciatura]. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México; 2013.

58. Teixeira C. Evaluation and validation of retrotransposons-based kits for DNA analysis of degraded biological evidence and rootless hair [Maestría]. Portugal: Universidad de Porto; 2016.
59. Butler J, Tomsey C, Kline M. Can the Validation Process in Forensic DNA Typing Be Standardized? [Internet]. USA: NIST; 2004 [cited 30 Septiembre 2018]. Available from: https://strbase.nist.gov/pub_pres/PromegaPaperOct2004.pdf.
60. Revised Validation Guidelines [Internet]. USA: FBI; 2004 [cited 30 Septiembre 2018]. Available from: https://archives.fbi.gov/archives/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/standards/2004_03_standards02.htm.
61. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods [Internet]. USA: Scientific Working Group on DNA Analysis Methods; 2016 [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: https://docs.wixstatic.com/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf.
62. Making Sense of Forensic Genetics [Internet]. Reino Unido: EUROFORGEN; 2017 [cited 25 Noviembre 2018]. Available from: <https://senseaboutscience.org/wp-content/uploads/2017/01/making-sense-of-forensic-genetics.pdf>.
63. Validation Guide for the DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 [Internet]. USA: Promega; 2010 [cited 01 Julio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/validation-guides/validation-guide-for-the-dna-iq-casework-pro-kit-for-maxwell-16.pdf?la=en>.
64. Validation Guide for the Plexor® HY System [Internet]. USA: Promega; 2008 [cited 01 Julio 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/applications-notes/validation-guide-for-the-plexor-hy-system/>.
65. Internal Validation Guide of Autosomal STR Systems for Forensic Laboratories [Internet]. USA: Promega; 2013 [cited 01 Julio 2018]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/validation-guides/internal-validation-of-autosomal-str-systems.pdf?la=en>.
66. Internal Validation Guide of Y-STR Systems for Forensic Laboratories [Internet]. USA: Promega; 2013 [cited 02 Octubre 2018]. Available from: <https://promega.media/-/media/files/resources/validation-guides/ge713-internal-validation-guide-of-y-str-systems-for-forensic-laboratories.pdf?la=en>.
67. Validation of the ABACard® p30 test For the Forensic Identification of Semen [Internet]. USA: Abacus Diagnostic; [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: http://www.abacusdiagnostics.com/ABACard_p30_Validation_Study.pdf.
68. Kristaly A, Smith D. Validation of the OneStep ABACard HemaTrace for the rapid forensic identification of human blood [Internet]. USA: Crime Laboratory Bureau; [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: http://www.abacusdiagnostics.com/Hematrace/5_Hematrace_Miami_Dade_Police.pdf.
69. Swander C, Stites J. Evaluation of the ABACard HemaTrace for the Forensic Identification of Human Blood [Internet]. USA: Michigan State Police; [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: http://www.4n6shop.cz/static_pages_files/file/Hematrace_Michigan%20State%20Police_Connie%20Swander_Jennifer%20Stites.pdf.
70. ABACard HemaTrace For The Forensic Identification of Human Blood at Crime Scenes USA: Abacus Diagnostics, Inc; 2017 [cited 19 Noviembre 2018].
71. Del Valle C, Rodríguez A, Espinoza M. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Revista de biología tropical*. 2004;52(3):717-25.
72. Slovák D, Zvárová J. Stochastic models for low level DNA mixtures. *EJBI*. 2012;8(5):25-30.
73. Butler J, McCord B. Validation Aspects to Consider in Bringing a New STR Kit "On-line" [Internet]. USA: National Institute of Standards and Technology; 2006 [cited 28 Noviembre 2018]. Available from: https://strbase.nist.gov/pub_pres/AAFS2006_validation.pdf.
74. Plexor® HY System [Internet]. USA: Promega; 2018 [cited 28 Noviembre 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/genetic-identity-workflow/human-specific-dna-quantitation/plexor-hy-system/?catNum=DC1001>.
75. Oostdik K, Lenz K, Nye J, Schelling K, Yet D, Bruski S, et al. Developmental validation of the PowerPlex(R) Fusion System for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standards. *Forensic science international Genetics*. 2014;12:69-76.
76. Buscher A, Arkens S, Kaurala D, Culhane S, Degroo G. Internal Validation and Implementation of the PowerPlex® Y23 System in a Casework Laboratory USA: Promega; 2014 [updated Internet; cited 30 Septiembre 2018]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/profiles-in>

dna/2014/internal-validation-and-implementation-of-the-powerplex-y23-system-in-a-casework-laboratory/.

77. Acreditación y sus beneficios [Internet]. México: ema; 2018 [cited 03 Octubre 2018]. Available from: http://www.ema.org.mx/portal_v3/index.php/la-acreditacion-y-sus-beneficios.

78. NOM-059-SSA1-2015 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos México: Diario Oficial de la Federación; [cited 03 Octubre 2018].

79. Relative fluorescence units [Internet]. México: Wikipedia; 2018 [cited 19 Noviembre 2018]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Relative_fluorescence_units.

GLOSARIO

Acreditación: acto por el cual una entidad de acreditación reconoce la competencia técnica y confiabilidad de los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, unidades de verificación, proveedores de ensayos de aptitud, productores de materiales de referencia y organismos de certificación para la Evaluación de la Conformidad.

Alelo: Forma en la que se manifiesta un fragmento de ADN en un lugar determinado, de entre todas las posibles.

Calidad: Al cumplimiento de especificaciones establecidas para garantizar la aptitud de uso.

Cromosoma: Estructura del ADN y proteínas asociadas que contienen el material genético dentro de las células. Los genes se encuentran localizados como fragmentos de ADN dentro de los cromosomas, aunque no todo el material genético son cromosomas.

Artefacto: Picos o actividad inexactos que son subproductos de la tecnología de PCR y electroforesis capilar.

Electroforesis: Proceso en el cual las moléculas se pueden separar de acuerdo con el tamaño y la carga eléctrica al aplicarles una corriente eléctrica..

Gen: Secuencia de nucleótidos que codifica una proteína.

Genoma: Conjunto de todos los factores hereditarios de la persona, que se encuentran en los 23 pares de cromosomas. El genoma humano lo conforma todo el ADN distribuido en los 23 pares de cromosomas.

Genotipo: En identificación forense, pareja de alelos existentes en determinado locus.

Fenotipo: Rasgos o características observables de un organismo, por ejemplo, el color del cabello, el peso o la presencia o ausencia de una enfermedad. Los rasgos fenotípicos no son necesariamente genéticos.

Heterocigoto: Poseer dos formas diferentes de un gen o locus particular, uno heredado de cada padre.

Homocigoto: Posesión de dos formas idénticas de un gen o locus particular, uno heredado de cada padre.

Límite de detección: Valor mínimo que es detectado por el equipo, el cual indica que todo lo que esté debajo de este valor es ruido.

Límite de linealidad: Por encima de este valor, la CCD cámara puede ser saturada y los picos no reflejarán la cantidad de señal relativa y podrían aparecer pull-ups.

Locus: Lugar en un cromosoma donde se encuentra un gen específico o una secuencia particular; una especie de dirección para el gen.

Perfil genético: Suma de las características obtenidas tras el estudio de diversos loci con el ADN.

Pull-up: Una señal de un alelo marcado con un colorante puede aparecer como un pico o alelo fuera de escala en otro conjunto de colorantes.

Polimorfismo: Gen que existe en más de una versión (alelo), y donde el alelo raro se puede encontrar en más del 2 por ciento de la población.

Stutter: Un artefacto de amplificación por PCR que es una unidad de repetición menor o mayor que el pico del alelo principal correspondiente.

Umbral analítico: Altura mínima requerida sobre la cual los picos detectados se pueden distinguir confiablemente del ruido de fondo.

Umbral estocástico: Valor por encima del cual es razonable suponer que las pérdidas alélicas no se han producido dentro de una muestra de una sola fuente.

Unidad de fluorescencia relativa: Se refieren a las mediciones de los métodos de electroforesis usados para el análisis de ADN. Una unidad de fluorescencia relativa es una unidad de medición utilizado en el análisis que emplea fluorescencia detección.

Validación: Demostrar que un proceso es robusto, reproducible y confiable a través de un intervalo de condiciones.

Verificación: Aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados.^(7, 9, 13, 77-79)