



---

---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**FISCALÍA GENERAL DEL ESTADO DE PUEBLA**

**LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE**

**TESIS**

**“VALIDACIÓN PARA LOS PARÁMETROS DE AMPLIFICACIÓN CON EL KIT  
GLOBALFILER™ EN FILTRO FTA CON MUESTRAS SANGUINEAS”.**

Para obtener el Título de

**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

**MARILYN DÍAZ RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**M.C.FLORENCIA BERTONI RUÍZ**

ASESOR INTERNO:

**M.C.CELESTE SANTAMARÍA JUÁREZ**

COMISIÓN REVISORA:

**DR. JOSÉ GUSTAVO LÓPEZ Y LÓPEZ**

**FAR. JUAN CARLOS BASTIDA HERRERA**

**DR. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA**

**11 DE NOVIEMBRE DE 2019**

## **DEDICATORIAS**

Con todo mi agradecimiento a mis hermanas

Sandra Díaz y Ana Belén Díaz

Quienes me dieron su apoyo y confianza para ayudarme a llegar hasta donde me encuentro ahora, haciendo de mí una mejor persona y han estado conmigo en los buenos y malos momentos.

A mi papa

José Trinidad Díaz

Quien me aconsejó desde que era pequeña para ayudarme a hacer la persona que ahora soy.

Con cariño

A mi sobrino Mateo

En el cual espero ser un ejemplo a seguir

A mi asesora

M.C. Celeste Santamaría Juárez

Por su apoyo, comprensión con lo cual no hubiese sido posible este trabajo

A mis profesores

José Gustavo, Juan Carlos y Alfonso

Por su paciencia, comprensión, tiempo y apoyo sin lo cual no hubiese sido posible este trabajo

A mis profesores de Fiscalía

Florencia, Jorge y Rogelio

Gracias por su apoyo, paciencia, tiempo, dedicación y confianza que siempre me demostraron y sin ello no hubiese sido posible este trabajo.

Gracias a Dios que sin él no lo hubiese logrado.

“La ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie (Polonia 1867-Francia 1934)

## ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Identificación de individuos .....	1
1.2. Genética Forense .....	2
1.2.1. Sistema ABO.....	2
1.3. Que es el ADN .....	3
1.3.1. Estructura del ADN.....	4
1.4. Polimorfismo.....	6
1.5. Marcadores Genéticos .....	7
1.6. Que es un perfil genético.....	9
1.6.1. Clasificación de muestras dubitadas e indubitadas .....	9
1.6.2 Extracción del ADN.....	10
1.6.2.1. Extracción orgánica.....	11
1.6.2.2.Extracción Chelex.....	11
1.6.2.3.Papel FTA.....	12
1.7. Purificación .....	13
1.8. Amplificación.....	14
1.9. Reacción en cadena de la polimerasa.....	14
1.9.1. PCR Multiplex .....	15
1.9.2. Etapas de un ciclo de reacción .....	16
1.10. Tipificación Genética .....	18

1.11. Electroforesis Capilar.....	19
1.12. Análisis de datos Software Genemapper ID-X.....	21
1.13. Validación.....	23
II.ANTECEDENTES.....	25
III.JUSTIFICACION.....	29
IV.HIPOTESIS.....	29
V.OBJETIVO.....	30
5.1 Objetivo General.....	30
5.2 Objetivo Específico.....	30
VI.METODOLOGIA.....	30
6.1. Materiales y Equipos.....	30
6.1.1. Equipos e Instrumentos.....	30
6.1.2. Reactivos.....	31
6.1.3. Sustancia de referencia.....	31
6.2. Procedimiento.....	31
6.2.1. Rotulación de la muestra.....	31
6.2.2. Obtención de la muestra.....	32
6.3. Procesamiento de la muestra.....	32
6.4. Condiciones de amplificación.....	32
6.5. Verificación.....	33

VII.DIAGRAMA DE FLUJO.....	34
VIII. RESULTADOS.....	35
12.1. GlobalFiler 20 Ciclos a 10 min de Extensión .....	36
12.2. GlobalFiler 20 Ciclos a 40 min de Extensión .....	37
12.3. GlobalFiler 22 Ciclos a 10 min de Extensión .....	38
12.4. GlobalFiler 22 Ciclos a 40 min de Extensión .....	39
12.5. GlobalFiler 24 Ciclos a 10 min de Extensión .....	40
12.6. GlobalFiler 24 Ciclos a 40 min de Extensión .....	41
IX.DISCUSIÒN .....	42
X.CONCLUSIÒN .....	44
XI.BIBLIOGRAFIA .....	45
XII.ANEXOS .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CONTENIDO DE LA FIGURA</b>	<b>PÀGINAS</b>
Figura 1.Molecula de ADN	3
Figura 2.Estructura primaria del ADN	4
Figura 3.Estructura Secundaria del ADN	5
Figura 4.Estructura Terciaria del ADN	5
Figura 5.Nombres de los 13 marcadores STR que constituyen el CODIS así como su posición en los cromosomas del genoma humano	8
Figura 6.Tarjeta de papel FTA	12
Figura 7.Protocolo de purificación	13
Figura 8.Grafico que representa las variaciones de temperatura de cada ciclo PCR	17
Figura 9.Cabina para PCR	18
Figura 10.Termociclador	18
Figura 11.Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer	20
Figura 12.Anàlisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar	21
Figura 13.Electroferograma del perfil genético de un individuo, el nombre de cada STR se muestra en la parte superior de cada carril. Debajo de cada pico se indican los alelos del individuo	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÀGINAS</b>
1.Tabla de Verificación	33
2.Còdigo de colores	35
3.Relaciòn de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 20 ciclos durante 10 min de extensión	36
4. Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 20 ciclos durante 40 min de extensión	37
5. Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 22 ciclos durante 10 min de extensión	38
6.Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 22 ciclos durante 40 min de extensión	39
7. Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 24 ciclos durante 10 min de extensión	40
8. Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 24 ciclos durante 40 min de extensión	41
9.Analisis de muestras en diferentes ciclos de extensión y tiempo	48
10.Paràmetros de Amplificación del Kit GlobalFiler™ de AmmpliedBiosystems	49
11.Ensayos realizados por el proveedor & ensayos propuestos por el laboratorio	49



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
STR	Short Tandem Repeats
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
Pb	Pares bases
TRIS	Compuesto orgánico para preparar disoluciones tampón
dNTP	Desoxirribonucleòtidos trifosfato
ng	Nanogramo
FTA	Flinders Technology Associates
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
$\mu$ l	Microlitro
KCl	Cloruro de Potasio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
Mg <sup>+2</sup>	Magnesio
RFU	Unidades Relativas de Fluorescencia
mm	Milímetro
rpm	Revoluciones por minuto

## I.INTRODUCCIÒN

### 1.1. Identificación de individuos

La palabra “identificar” es reconocer si una persona es la que se busca, lo cual radica en establecer su individualidad determinando aquellos rasgos o conjunto de cualidades que la distinguen de todas las demás y hacen que sea única e irrepetible. La identificación de las personas cobra una gran importancia en el marco legal, tanto en el caso de sujetos vivos como de cadáveres y se basa en aspectos como (Luna Polo Castillo, 2013):

Datos fisonómicos:

- ✓ Sexo
- ✓ Peso, talla y edad aproximada
- ✓ Color, tipo y forma de implantación del cabello, abundancia o ausencia
- ✓ Color de ojos y de piel
- ✓ Raza
- ✓ Marcas corporales como tatuajes, cicatrices, patologías.

Huellas dactilares: Son las impresiones de las arrugas o superficie de la piel de las falanges de los dedos, útiles en grado máximo como medio de identificación ya que una persona jamás tendrá las mismas huellas que otra.

Individualización dental: Los dientes son las piezas del cuerpo más resistentes a la destrucción tanto física como química, el estudio detallado permite conocer raza, sexo, talla y edad aproximada.

Identificación por medio del ADN: Los perfiles de ADN, originalmente eran conocidos también como huellas genéticas que consiste en secuencias repetidas de ADN.

## **1.2. Genética Forense**

El Colegio Mexicano de Ciencias Forenses nos da una definición “la genética forense es el análisis de los polimorfismos responsables de la variabilidad genética en la población humana aplicados a los problemas judiciales”, éstos pueden ser (Rodríguez Carlin, y otros, 2010):

Investigaciones de paternidad, dadas por alguna reclamación por parte de uno de los progenitores del menor en cuestión.

Criminalística especialidad en la resolución de asesinatos y delitos sexuales donde con ayuda de los restos humanos como son la sangre, el pelo, la saliva, el esperma y la piel pueden descubrirse hechos vinculados a una acción delictiva.

Identificación de restos cadavéricos antiguos o de personas desfiguradas de interés judicial.

La Genética forense evolucionó directamente a partir de otra rama conocida como “Hemogenética forense “la cual nace a principios del siglo XX cuando Karl Landsteiner describe el sistema ABO de los hematíes y Von Dürgen y Hirschfeld descubren su transmisión hereditaria. Esta ciencia surgió como una rama de la Criminalística cuyo objetivo era la identificación genética, tanto en casos de investigación criminal como en estudios de paternidad. Pero fue a mediados del siglo XX cuando gracias al descubrimiento del ADN y de su estructura y el avance de las técnicas de análisis de dicha molécula, la Hemogenética Forense, evolucionó considerablemente hasta que hoy se habla de una subespecialidad dentro de la Medicina Forense: la Genética Forense (Luna Polo Castillo, 2013).

### **1.2.1. Sistema ABO**

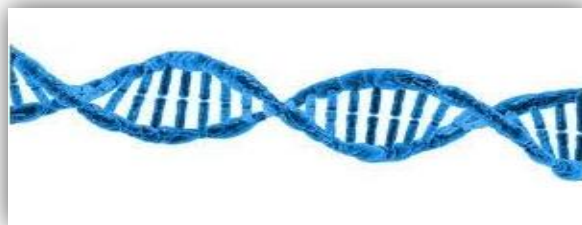
El descubrimiento del grupo sanguíneo ABO en el año de 1900 por el científico austriaco Karl Landsteiner, que causó un gran entusiasmo en la comunidad científica ya que hasta entonces toda la sangre se consideraba igual en todas las personas. Los antígenos del grupo sanguíneo ABO no

sólo se encuentran en los glóbulos rojos o eritrocitos; se hallan también en otras células y en fluidos corporales (saliva, orina y semen).

El gen vinculado al sistema ABO, se encuentra en el cromosoma 9 y posee 3 alelos que son el A, B y el O, que varían de acuerdo a las sustituciones de nucleótidos, las cuales determinan las especificidades de las enzimas glucositransferasas para las cuales codifican, los genes que determinan los grupos sanguíneos que se heredan y estos se convierten en marcadores genéticos importantes para el estudio de la estructura genética (Arbeláez García, 2009).

### **1.3. Que es el ADN**

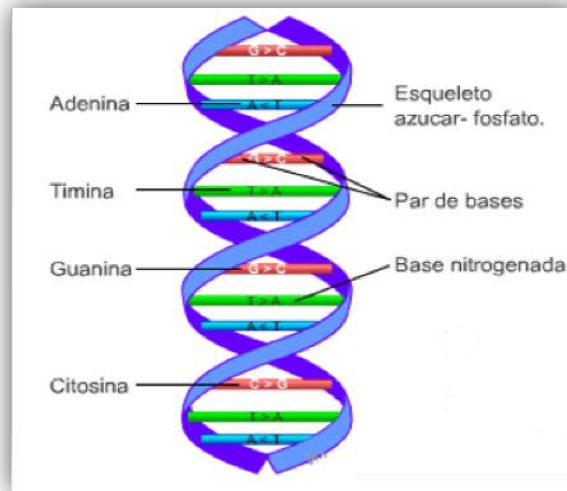
El ADN fue descubierto por Miescher en 1869, pero recientemente se le identificó como portador de información genética a mediados del siglo XX. El ADN, ácido desoxirribonucleico compuesto orgánico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y función de todos los organismos vivos también es un polímero formado por dos cadenas antiparalelas constituidas por nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno, descrito por primera vez por James Watson y Francis Crick en 1953 que sugieren un modelo tridimensional para la estructura del ADN, obtenido a través del análisis de los patrones de difracción de Rayos X de muestras cuya humedad relativa era superior al 75% (Castro del Barrio, 2016).



**Figura 1.** Molécula de ADN

### 1.3.1. Estructura del ADN

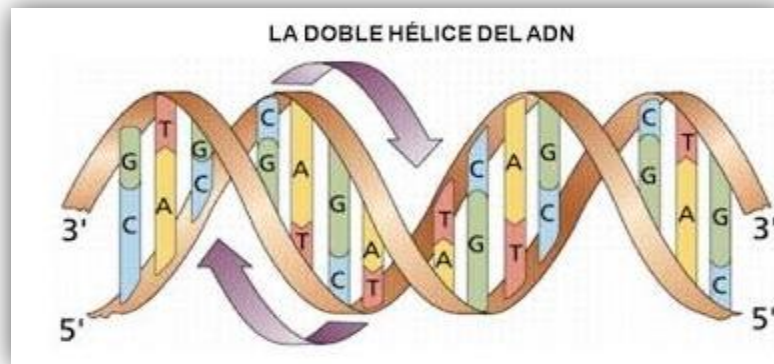
*Estructura primaria:* El ADN es un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido contiene: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. En el ADN hay 4 nucleótidos diferentes que difieren solamente en la base nitrogenada, estas son Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G), Timina (T):



**Figura 2.**Estructura Primaria del ADN

Por ello la secuencia de ADN se especifica nombrando únicamente la secuencia de sus bases (Luna Polo Castillo, 2013)

*Estructura secundaria:* En los seres vivos se presenta el ADN como una estructura de doble hélice, las dos cadenas están estabilizadas por puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de cada cadena (A con T) y (C con G) manteniendo juntas las dos cadenas. Esto implica que si en una cadena se encuentra la secuencia 5'...CGTTGTAAGCC...3' en la otra debemos encontrar 3'...GCAACASTTCGG...5', a cada apareamiento (G-C, A-T) se le llamará par de bases (Juvenal, Gangitano, & Padula, 2001).

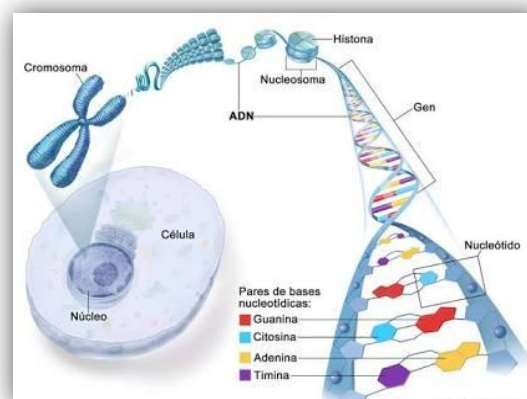


**Figura 3.** Estructura Secundaria del ADN

*Estructura terciaria:* Dentro de la célula, el ADN está organizado en estructuras llamadas cromosomas. El número de cromosomas es constante para las células de una misma especie. Los seres humanos tienen 46, 23 pares. De estos 23 pares se distinguen:

- ✓ 22 autosómicos
- ✓ 1 sexual, cromosoma X o Y

Se dice que tienen pares de cromosomas puesto que los seres humanos son diploides. Es decir, todas sus células tienen 23 cromosomas recibidos de la madre y 23 recibidos del padre (Castro del Barrio, 2016).



**Figura 4.** Estructura Terciaria del ADN

#### 1.4. Polimorfismo

La mayoría de nuestro ADN 99.7% es el mismo entre las personas. Sólo una pequeña fracción de nuestro ADN (0.3% o 10 millones de nucleótidos) es diferente entre las personas y nos hacen individuos únicos. Estas regiones variables de ADN proporcionan la capacidad de usar información de ADN para fines de identidad humana (Butler, 2005).

Esto se debe a que como se menciona con anterioridad, un cromosoma de cada par se hereda del padre y otro de la madre, cada cromosoma de un par dado es independiente del otro. Se puede recibir de los progenitores las combinaciones posibles  $2^{23+23} = 2^{46}$ .

La combinación de cromosomas que presenta un individuo es conocida como genotipo. El conjunto de rasgos que caracteriza a un individuo como resultado del genotipo se denomina fenotipo.

De todo el ADN nuclear, sólo el 10% aproximadamente es el que porta el código genético con la información que configuran los genes (ADN codificante) es compartido prácticamente en su totalidad, por todos los seres humanos, pues es el que determina a cada especie, cada variación en un gen, que conlleva a una variación en la proteína que codifica y esto se refleja en los distintos grupos sanguíneos, el 90 % restante de ADN es no codificante, también llamado ADN repetitivo, el cual es una secuencia corta repetida en forma de copias idénticas (Rangel Tadeo, 2013).

Entre éstas hay dos clases.

- ✓ ADN moderadamente repetitivo. Se les llama elementos interespaciadores repetitivos.
- ✓ ADN altamente repetitivo. Está formado por cortas secuencias que se encuentran repetidas en tándem (STR), debido a su corto tamaño la secuencia se puede definir

como VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o STR (Short Tandem Repeats) dependiendo del tamaño.

Para la tipificación en genética forense, se estudian zonas de alta variabilidad del ADN no codificante y sus diferentes polimorfismos. Estas zonas son conocidas como marcadores genéticos o locus (Castro del Barrio, 2016).

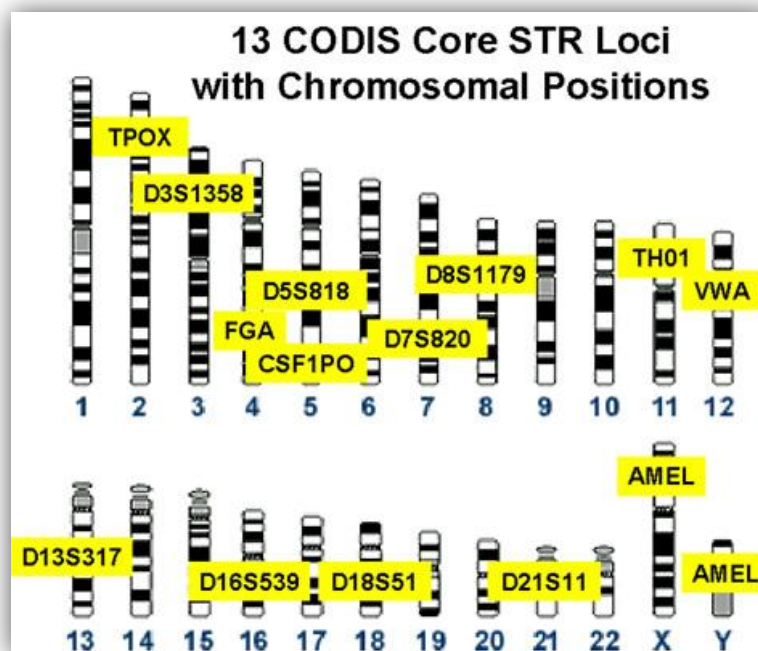
### **1.5. Marcadores Genéticos**

Desde hace casi un siglo, para estudiar variaciones entre los individuos se utilizan los llamados polimorfismos o marcadores genéticos moleculares, los STR son regiones altamente polimórficas que se encuentran a lo largo de todo el genoma, compuesto por una secuencia de 2-7 pb que se repite la unidad de secuencia (Rangel Tadeo, 2013).

El uso de marcadores de ADN cortos repetidos en tándem para las pruebas de identidad humana, se han vuelto populares para la tipificación de ADN forense porque están basados en PCR y funcionan con plantillas de ADN de baja cantidad o muestras de ADN degradadas. Los métodos de tipificado STR son susceptibles de automatización e involucran detección fluorescente sensible, que permite a los científicos recolectar datos rápidamente de estos marcadores (Butler, 2005).

Se ha sugerido por parte del FBI (siglas de Federal Bureau Investigation) entre otros organismos, el uso de 13 STR, los cuales son secuencias de cuatro nucleótidos para identificación genética humana que constituyen el CODIS siglas de combined ADN Index System que es un conjunto de STR sugerido para la identificación humana, con el fin de crear bases de datos de perfiles genéticos que permitan intercambiar información de interés para la impartición de justicia, etc.(crímenes violentos, asalto sexual y asesinatos) los cuales son suficientes para resolver la mayoría de casos (Rangel Tadeo, 2013).





**Figura 5.** Nombres de los 13 marcadores STR que constituye el CODIS así como su posición en los cromosomas del genoma humano.

Su nomenclatura utilizada para designar a un marcador genético se basa en su ubicación cromosómica. Si el marcador está dentro de un gen en específico muy cerca de él y si dicho gen tiene alguna función conocida y se le ha designado un nombre, el marcador genético tendrá un nombre derivado con relación a dicho gen (Luna Polo Castillo, 2013).

Un ejemplo es el marcador FGA que deriva de su nombre por estar en el gen que codifica a la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (Human Fibrinogen alpha chain). Sin embargo, aún no se conoce la totalidad de los genes, a pesar de haberse obtenido la secuencia del genoma humano. Para los fragmentos de ADN que se encuentran fuera de las regiones génicas se pueden designar por su posición cromosómica de los cuales no se conoce aún su función, se sigue la siguiente nomenclatura:

✓ D: designada al ADN

- ✓ Numero de cromosomas 1, 2,3, 4,5.....X, Y o N cuando es multilocus
- ✓ S, Z, F se refiere a la complejidad del segmento
- ✓ S: secuencia de copia única
- ✓ Z: segmento repetitivo en sitio específico
- ✓ F: secuencia homóloga en múltiple cromosomas

Otro ejemplo es la designación D16S539 hace referencia a un fragmento único de ADN en el cromosoma 16, identificado con el número 539, mientras que en el D1S80 es un fragmento único en el cromosoma 1 con número de segmento 80.

Estos marcadores determinan el perfil genético de un individuo.

## **1.6. Que es un perfil genético**

Un perfil genético no es más que una serie de números, es decir, alelos característicos de cada individuo referidos a una serie de fragmentos de ADN (marcadores genéticos), cada marcador genético es un fragmento de ADN de unas 100-500 unidades (pares bases), es decir estudiamos una parte mínima de todo el ADN que tiene un individuo (Prieto L., 2014).

Por otra parte para obtener un perfil genético se pueden utilizar muestras dubitadas e indubitadas.

### **1.6.1. Clasificación de muestras dubitadas e indubitadas**

Muestra dubitadas o evidencias: son restos biológicos de procedencia desconocida, es decir, no se sabe a quién pertenecieron un ejemplo las muestras recogidas en un delito o levantamiento de un cadáver no identificado.

Los tipos de muestras dubitadas más frecuentes que se analizan por técnicas genético moleculares son: sangre (por lo general en forma de mancha), semen (lavados vaginales o

manchas en la ropa de la víctima), saliva (colillas de cigarrillos, chicles), pelos, uñas, tejidos blandos, restos óseos y dentarios estos últimos relacionados con la identificación de cadáveres.

Muestras indubitadas o de referencia inicial: son restos biológicos de procedencia conocida, es decir, se sabe a quién pertenecen, por ejemplo la sangre tomada de un cadáver ya identificado o las muestras tomadas a familiares de un desaparecido. El tipo de muestras indubitadas son sangre, saliva y frotis bucal.

Es por eso que para la genética forense, son de interés los denominados indicios biológicos que son los que contienen al ADN. Un indicio biológico se puede definir como toda sustancia líquida o sólida que provenga directamente del cuerpo humano o que haya estado en contacto con el mismo, y en cuya superficie o interior pueda haber restos de células (Mis Blogs, 2012).

Los indicios biológicos para su extracción de ADN puede ser por medio de la sangre, ya que es un tejido líquido, al que se le puede considerar como una variedad de tejido conectivo, que circula por el aparato cardiovascular gracias a los impulsos que proporciona el corazón es una fuente excelente de ADN de evidencia biológica, asociada a muchos casos de crímenes violentos (Macias Peña, 2010)

### **1.6.2 Extracción del ADN**

En otras palabras una muestra obtenida de una escena del crimen en forma de una mancha de sangre, semen, muestra de sangre líquida de un sospechoso o caso de paternidad contiene una cantidad de sustancias además del ADN. Las moléculas de ADN deben separarse de otros materiales celulares antes de que puedan ser examinadas. . 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.

Existen tres técnicas principales para la extracción de ADN utilizadas en el laboratorio forense a continuación se describe cada una de ellas siendo para nosotros de relevancia la de Papel FTA ya que es con la que se trabaja en el laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía del Estado de Puebla:

**1.6.2.1. Extracción orgánica** implica la adición en serie de varias sustancias químicas. Primero se agregan el dodecilsulfato de sodio y la proteinasa K para romper las paredes celulares y descomponer las proteínas que protegen las moléculas de ADN mientras están en los cromosomas. A continuación, se agrega una mezcla de fenol / cloroformo para separar las proteínas del ADN. El ADN es más soluble en la porción acuosa de la mezcla orgánica-acuosa. Cuando se centrifugan, las proteínas no deseadas y los restos celulares se separan de la fase acuosa y las moléculas de ADN de doble cadena se pueden transferir limpiamente para su análisis. Si bien el método de extracción orgánica funciona bien para la recuperación de ADN de alto peso molecular, requiere mucho tiempo, implica el uso de sustancias químicas peligrosas y requiere que la muestra se transfiera entre múltiples tubos (un hecho que aumenta el riesgo de error o contaminación).

**1.6.2.2. Extracción de Chelex** es el uso de una suspensión de resina quelante que se puede agregar directamente a la muestra (por ejemplo manchas de sangre o semen). Introducido en 1991 a la comunidad de ADN forense, Chelex está compuesto de copolímeros de estireno divinilbenceno que contienen pares de iones que actúan como grupos quelantes en la unión de iones de metal polivalente, como el magnesio. Al igual que las limaduras de hierro a un imán, los iones de magnesio se dibujan y se unen. Al eliminar el magnesio de la reacción, las enzimas que destruyen el ADN conocidas como nucleasas se inactivan y las moléculas de ADN quedan así protegidas. En la mayoría de los protocolos, se añaden muestras biológicas tales como manchas

de sangre a una suspensión de Chelex al 5% y se hierven durante varios minutos para abrir las células y liberar el ADN (Butler, 2005).

**1.6.2.3. Papel FTA** a finales de los años ochenta, Lee Burgoyne, de la Universidad de Flinders en Australia, desarrolló papel de FTA como método para el almacenamiento de ADN. El papel FTA es un absorbente a base de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas para proteger las moléculas de ADN (Butler, 2005). Este realiza lisis de las células y desnaturalización de las proteínas, mientras que los ácidos nucleicos son extraídos y protegidos en las fibras del papel. Por lo anterior la mayoría de las muestras recabadas en este filtro son óptimas para un estudio genético, ya que cuentan con las condiciones y cantidad necesaria de ADN (Almacenamiento/Papel FTA Whatman, 2014).

#### VENTAJAS DE UTILIZAR PAPEL FTA:

- ✓ Proteger las moléculas de ADN de la degradación por nucleasas
- ✓ Obtener resultados consistentes sin cuantificación
- ✓ Almacenamiento a temperatura ambiente
- ✓ ADN listo en menos de 30 minutos
- ✓ Impide la proliferación de bacterias o de hongos
- ✓ Protege al ADN de degradaciones debidas al entorno
- ✓ Reduce la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras.



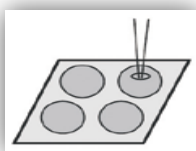
**Figura 6.**Tarjeta en papel FTA

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 glóbulos blancos se inmoviliza dentro de la matriz del papel. Se obtiene una perforación del papel de la mancha de sangre de la tarjeta FTA y se coloca en un tubo para lavarlo (Butler, 2005).

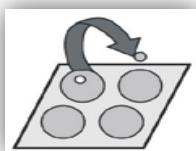
### 1.7. Purificación

El ADN unido puede luego purificarse lavándolo con un disolvente para eliminar el hemo y otros inhibidores de la reacción de PCR. Esta purificación de la perforación de papel puede verse visualmente porque a medida que se lava el papel, el color rojo se elimina con el sobrenadante.

Protocolo de purificación en tarjeta FTA indicado por el proveedor.



Aplicar la muestra y dejar secar



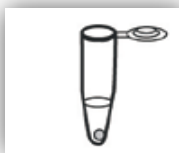
Cortar un disco de 1.20 mm del área de depósito de la muestra



Colocar el disco en un tubo PCR y lavar 3 veces con reactivo de purificación - eliminar el reactivo después de cada lavado



Lavar 2 veces con tampón TE-1 (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8) y eliminar el tampón utilizado después de cada lavado



Secar el disco en el tubo PCR



Añadir directamente la mezcla PCR

**Figura 7.** Protocolo de purificación

La perforación limpia se agrega directamente a la reacción de PCR.

### **1.8. Amplificación**

Una vez que se tiene la muestra en tarjetas de papel FTA y se ha purificado el ADN mediante lavados; se puede amplificar la muestra más de un millón de veces del ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

### **1.9. Reacción en cadena de la polimerasa**

Fue desarrollada por Kary Mullis, la PCR es una técnica de biología molecular que facilita la amplificación *in vitro* de un fragmento en específico de ADN de manera exponencial y nos va a permitir obtener millones de copias de una muestra mínima de ADN (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013, págs. 70-71).

El ADN de las escenas del crimen a menudo está limitado tanto en cantidad como en calidad y la obtención de una muestra más limpia y concentrada normalmente está fuera de discusión. La tecnología de amplificación de ADN de PCR es muy adecuada para el análisis de muestras de

ADN forense porque es sensible, rápida y no está limitada por la calidad del ADN como lo son otros métodos.

La PCR se ha simplificado en los últimos años por la disponibilidad de kits de reactivos que permiten que en un laboratorio de ADN forense simplemente agregue una plantilla de ADN a una mezcla de PCR prefabricada que contenga todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación. Estos kits se optimizan a través de extensos esfuerzos de investigación por parte de los fabricantes comerciales. Los kits se preparan típicamente para que el usuario agregue una alícuota de la solución del kit a una cantidad particular de ADN genómico. Los mejores resultados con estos kits comerciales se obtienen si la plantilla de ADN se agrega en una cantidad que corresponde al rango de concentración diseñado para el kit.

El Kit GlobalFiler™ PCR Amplification de AppliedBiosystems conjunto de marcadores genéticos STR que pueden ser analizados simultáneamente lo cual, permite amplificar hasta 23 marcadores (secuencias polimórficas específicas de uso forense para determinar genotipos) y un marcador sexual llamado amelogenina que define el sexo de la muestra (reacción multiplex).

### **1.9.1. PCR Multiplex**

La amplificación simultánea de dos o más regiones de ADN se conoce comúnmente como PCR multiplexada o múltiple. Emplea dos o más pares de cebadores en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente diferentes fragmentos de ADN. Consiste en combinar en una reacción todos los pares de cebadores de las secuencias que se quieren amplificar, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes (Greif, 2004).

#### Ventajas

- ✓ Ahorro de tiempo se obtiene la información de varios loci en una sola reacción.
- ✓ Ahorro económico requiere menor cantidad de molde para el análisis



- ✓ Ahorro de muestra y menor cantidad de reactivos

Los componentes típicos para la amplificación de PCR son los siguientes:

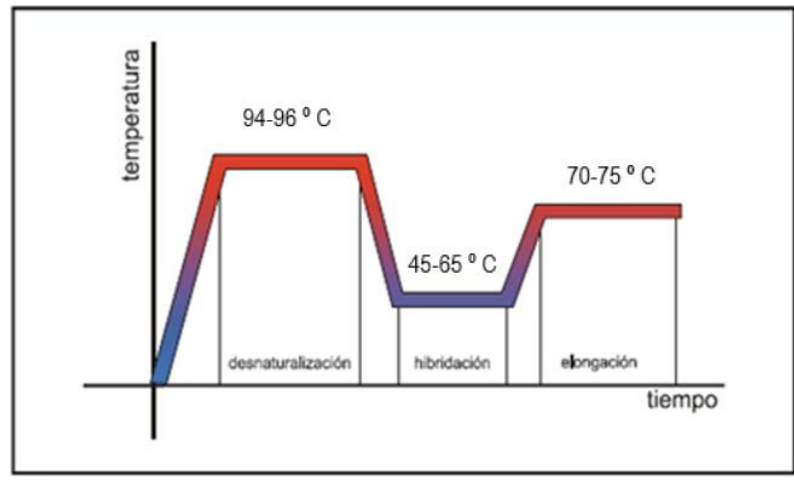
- ✓ Tris-HCl, pH 8.3 (25°C)
- ✓ Cloruro de Magnesio
- ✓ Cloruro de Potasio
- ✓ Desoxinucleotido trifosfato (dNTPs)
- ✓ DNA Polimerasa, térmicamente estable
- ✓ Primers
- ✓ Plantilla de ADN

### **1.9.2. Etapas de un ciclo de reacción**

La PCR consiste en una serie de ciclos que se realizan automáticamente en un termociclador este mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo que se realiza automáticamente, donde suceden los siguientes tres pasos en cada ciclo:

- 1) Desnaturalización se somete al ADN a temperaturas de 94-96° C durante unos minutos para romper los puentes de hidrógeno y separar así las dos hebras de ADN por completo.
- 2) Alineamiento o hibridación se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 45 y 65°C donde las secuencias cortas conocidas como primers o cebadores delimitan las regiones que se van a replicar en la hebra molde.
- 3) Extensión o elongación a una temperatura de 70-75°c para asegurar que todos los sitios de amplificación estén terminados y se hayan formado cadenas nuevas de ADN por acción de la Taq polimerasa, enzima termoestable capaz de añadir nucleótidos a los extremos de los primers (aislada a partir de la bacteria termófila *Thermus Aquaticus*) cataliza de manera muy efectiva la reacción de unión de nucleótidos en el extremo 3' del cebador, utilizando como molde la hebra

de ADN. La reacción debe llevarse a cabo en un buffer de KCl, TRIS y  $MgCl_2$ , ya que los iones  $Mg^{+2}$  actúan como cofactores de la polimerasa. Los nucleótidos empleados son dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato) y no deben añadirse en gran concentración porque inhibirían la reacción al no tener la Taq polimerasa magnesio suficiente para añadirlos al cebador (Rangel Tadeo, 2013).



**Figura 8.** Gráfico que representa las variaciones de temperatura de cada ciclo PCR

En cada ciclo de PCR se duplica la secuencia de interés STR, por lo que sólo en 25 ciclos teóricamente habrá millones de copias, a lo que se conoce como amplificación (Rodríguez Sánchez & Barrera Saldaña, 2004).

Una PCR típica para fines forenses tiene 29 ciclos y no se suelen utilizar más salvo circunstancias excepcionales y controles estrictos para monitorear la contaminación (Cols & Anderson).



**Figura 9.** Cabina para PCR



**Figura 10.** Termociclador

### 1.10. Tipificación Genética

Los productos de PCR a partir de ADN de repetición en tándem deben separarse de manera que permita que cada alelo se diferencie uno del otro. El medio de separación puede estar en forma de un gel de placa o un capilar a esto se le llama "electroforesis" proviene del griego (carga) y del latín (portador). Por lo tanto, el proceso de electroforesis se refiere a las cargas eléctricas que llevan las moléculas. En el caso del ADN, los grupos fosfato en la cadena principal de la molécula de ADN tienen una carga negativa. Los ácidos nucleicos son ácidos por lo que los grupos fosfato abandonan fácilmente sus iones  $H^+$ , lo que los hace tener una carga negativa en la mayoría de los sistemas de tampón. Bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas de ADN migrarán lejos del electrodo negativo, conocido como el cátodo, y se moverán hacia el electrodo positivo, conocido como el ánodo. Cuanto mayor sea el voltaje, mayor será la fuerza que sienten las moléculas de ADN y más rápido se moverá el ADN. El movimiento de iones en un campo eléctrico que genera calor.

### 1.11. Electroforesis Capilar

Las primeras separaciones electroforesis capilar de ADN se realizaron hace poco más de una década a finales de los años ochenta. Desde la introducción de la nueva instrumentación electroforesis capilar a mediados de la década de 1990, la técnica ha ganado popularidad rápidamente y por una buena razón. Si bien la electroforesis en placas de gel ha sido una técnica comprobada durante más de 30 años, hay una serie de ventajas para analizar el ADN en un formato capilar (Butler, 2005).

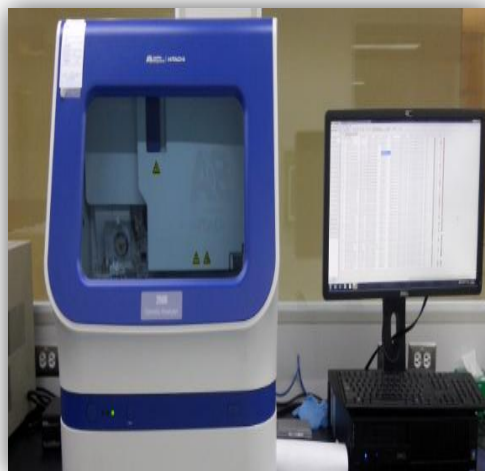
Algunas ventajas son:

- ✓ Los pasos de inyección, separación y detección se pueden automatizar por completo
- ✓ Permite que múltiples muestras se ejecuten sin supervisión
- ✓ Solo se consumen cantidades mínimas de muestra en el proceso de inyección
- ✓ Las muestras se puede volver a probar fácilmente si es necesario.
- ✓ La separación en los capilares se puede realizar en minutos en lugar de horas debido a los voltajes más altos que se permiten con la disipación de calor mejorada de los capilares
- ✓ No existe el temor a la contaminación cruzada de las muestras

Desventaja:

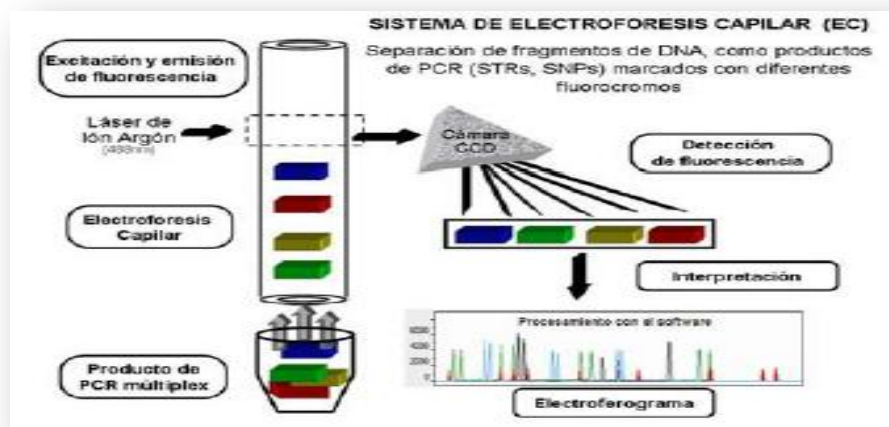
- ✓ Costos elevados por lo que no todos los laboratorios pueden contar con esta técnica.

Los elementos principales de un instrumento de electroforesis capilar, incluyen un capilar estrecho, dos viales de protección y dos electrodos conectados a una fuente de alimentación de alta tensión. Los sistemas electroforesis capilar también contienen una fuente de excitación láser, un detector de fluorescencia, un muestreador automático para sostener los tubos de muestra y una computadora para controlar la inyección y detección de la muestra (Butler, 2005).



**Figura 11.** Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer

La detección de la muestra se realiza automáticamente por el instrumento de electroforesis capilar midiendo el intervalo de tiempo desde la inyección de la muestra hasta la detección de la muestra con un láser colocado cerca del extremo del capilar. La luz del láser se aplica al capilar en una posición fija donde se ha quemado una ventana en el revestimiento del capilar. Los fragmentos de ADN se iluminan a medida que pasan por esta ventana en el capilar. Al igual que con los geles, las moléculas más pequeñas llegarán primero al punto de detección seguido de las moléculas más grandes. Los datos de las separaciones de la electroforesis capilar se trazan en función de la intensidad de fluorescencia relativa observada a partir de la emisión de fluorescencia de los colorantes que pasan por el detector (Butler, 2005).



**Figura 12.** Análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar

### 1.12. Análisis de datos Software Genemapper ID-X

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son marcadores con etiquetas fluorescentes, para posteriormente ser separados en función a su tamaño por medio de la electroforesis. La información recopilada durante la electroforesis es procesada por el software obteniendo un electroferograma: un patrón de picos y valles donde está contenida la información necesaria para un perfil genético (Castro del Barrio, 2016).

- ✓ Eje Vertical: RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia). Unidad de medida de la intensidad de la luz captada por la cámara CCD.
- ✓ Eje Horizontal: Tiempo en (minutos o segundos). La electroforesis dura aproximadamente 30 minutos. Hay un pico que corresponde a un loci no polimórfico. Este loci es la amelogenina, gen que reside en el cromosoma X e Y. El cromosoma X es más pequeño que el cromosoma Y, este loci determinaran el sexo del perfil genético:
- ✓ Mujer se observa XX = un solo pico

- ✓ Hombre se observa XY=dos picos

Cada uno de los picos presentes en el electroferograma, además de determinar el perfil genético aporta más información:

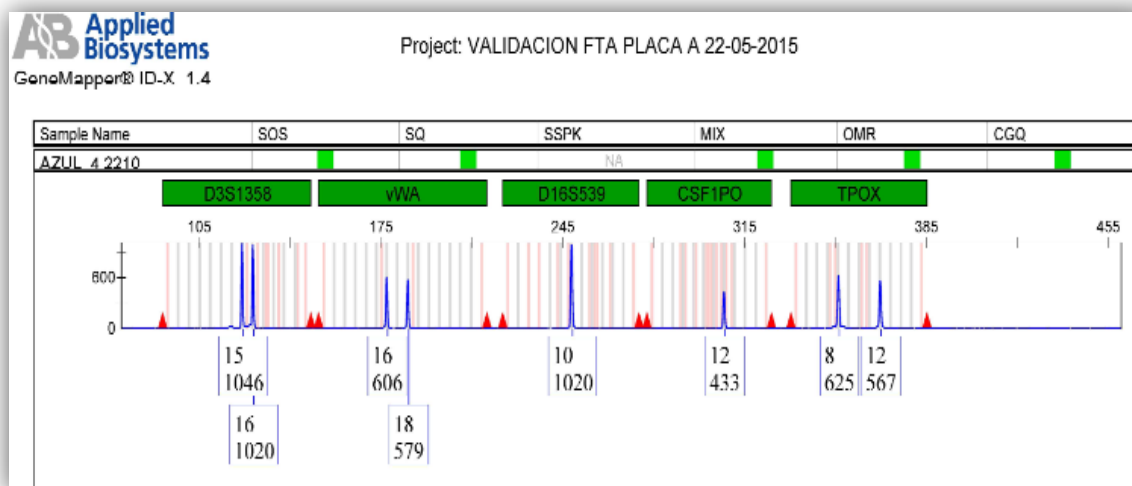
- ✓ Cada grupo de pico corresponde a un loci
- ✓ Cada pico de un loci corresponde a un alelo
- ✓ El alelo asociado a cada pico es determinado por el software
- ✓ La longitud depende de las repeticiones en tándem (STR)

Numero de picos

- ✓ 1 pico- la persona es homocigota a ese alelo
- ✓ 2 picos-la persona es heterocigota a ese alelo
- ✓ 3 o más picos-posible mezcla o contaminación de la muestra

Posición del pico. Los alelos más pequeños se encuentran a la izquierda del electroferograma mientras que los más grandes se sitúan en la parte derecha.

Altura del pico. Será proporcional a la cantidad de ADN que haya en la muestra.



**Figura 13.** Electroferograma del perfil genético de un individuo, el nombre de cada STR se muestra en la parte superior de cada carril. Debajo de cada pico se indican los alelos del individuo.

La interpretación de un perfil genético es una prueba científica que genere información ya sea en la identificación humana, casos criminales o para establecer parentesco, no indican características físicas o patológicas de la persona, ya que se analizan secuencias que no codifican proteínas, lo que significa que no tiene una función específica para el organismo, las cuales deben realizarse con sumo cuidado. La tipificación de ADN no es una excepción ya que es un proceso de varios pasos que deben ser realizados por personal capacitado para garantizar que se obtengan e interpreten correctamente resultados precisos mediante pruebas que aseguren la calidad una de ellas es la validación (Butler, 2005).

### **1.13. Validación**

Las pruebas de ADN son una herramienta de investigaciones capaces de aplicar la ley con resultados que resisten el escrutinio legal en los tribunales. Cuando los laboratorios no siguen protocolos validados, pueden surgir problemas es por eso que cuando se habla de la importancia de mantener buenas prácticas de laboratorio para obtener resultados científicos precisos, se hace referencia a dos temas: control de calidad y el aseguramiento de calidad. El aseguramiento de la calidad se refiere a aquellas acciones planificadas o sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio satisfará los requisitos de calidad dados. El control de calidad por otro lado, generalmente se refiere a las técnicas operativas cotidianas y las actividades utilizadas para cumplir con los requisitos de calidad. Por lo tanto, una organización planificará medidas de control de calidad y llevará a cabo actividades de control de calidad en el laboratorio (Butler, 2005).

La validación es la confirmación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos para la utilización o aplicación específica del método a utilizar, es necesario validar para cumplir con requerimientos de acreditación de normas internacionales tal como la NOM



ISO/IEC 17025 de acreditación de laboratorios de ensayo y de calibración (Grupo Empresarial ACCE, Norma ISO, 2005).

La validación de los métodos debe realizarse de acuerdo a lo siguiente:

- ✓ Límite de Detección: valor mínimo que es detectado por el equipo, el cual indica que todo lo que esté debajo de 175 RFU es ruido.
- ✓ Reproducibilidad: coincidencia entre los resultados de mediciones realizadas en diferentes condiciones de medición en un mismo laboratorio o entre 2 laboratorios.
- ✓ Precisión: grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero.
- ✓ Repetibilidad: precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

El nivel más alto en las pruebas es el análisis de muestras de control de calidad en las que se analizan estándares o muestras con cantidades conocidas y se comparan los resultados experimentales con teóricos así que se validan los métodos para emitir resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para generar la confianza de quién los necesite por eso es recomendable utilizar estos métodos cuando estos estén disponibles y sean apropiados para el laboratorio. Sin embargo se tienen que cumplir con ciertos requisitos para el proceso de validación estos son (San Miguel, 2011)

- ✓ Definición del método: Documento escrito donde se describa a detalle lo que se realizara consultar (tabla de anexos 9 y 10)

- ✓ Determinación de los parámetros del método: Consultar en el formato de procedimientos normalizados de operación que lleva por título “validación para los parámetros de amplificación con el Kit GlobalFiler™ en filtro FTA con muestras sanguíneas”.
- ✓ Declaración del método validado: Los parámetros anteriores en cualquier validación deben ser tomados de inicio como el fabricante los recomienda y una vez realizadas las validaciones se calcularán los propios para los kits y condiciones dentro del laboratorio las modificaciones sustanciales en el método deben ser comparadas con el procedimiento original utilizando muestras idénticas o equivalentes.

La validación interna para FTA debe incluir los siguientes criterios:

- ✓ Muestras conocidas (controles positivos de muestras de sangre tomadas en el laboratorio, sin relación con algún caso, cuyo perfil sea conocido de antemano)
- ✓ Número de ciclos para resultado óptimo.
- ✓ Probar con tiempos de extensión diferentes (si se considera necesario).
- ✓ Reducción de volumen de mezcla de reacción.

La comunidad científica debe documentar cuidadosamente la validez de las nuevas técnicas y tecnologías para asegurar que los procedimientos que se realizan en el laboratorio son precisos y confiables (Anigen, 2014).

## **II.ANTECEDENTES**

La validación interna es importante antes de implementar un procedimiento, con anterioridad se han realizado otros estudios de validación:

**Validación Interna y análisis comparativo de PowerPlex® Fusion y el GlobalFiler™ Express Amplification Kits para amplificación directa.**

En el 2010 se realizaron estudios de sensibilidad, precisión, concordancia, reproducibilidad, como parte de un estudio de validación interna utilizando Biosystems® 3500 Analizador Genético. El objetivo de este estudio fue validar que los kits comerciales producen resultados fiables y robustos, además de identificar un único parámetro de ciclo térmico y tiempo de inyección simple para ambos sistemas usando tarjetas FTA (sangre, saliva y muestras bucales). Se utilizaron dos de los más novedosos kits de PCR directa PowerPlex® Fusión y el kit de amplificación GlobalFiler™ Express. Estos kits fueron utilizados para la validación permitiendo al Departamento de Ciencias Forenses evaluar únicamente las desventajas de ambos kits para elegir el que mejor se adapte a sus necesidades.

Ambos kits de amplificación producen resultados robustos y confiables con el PowerPlex® fusión 26 ciclos con una inyección de 12 segundos para la sangre y la saliva en las tarjetas FTA, así como bucal y muestras de hisopo. La amplificación implicó una perforación de 1.2 mm de saliva o sangre en FTA y 2 µl de ADN de hisopo. Estas muestras pueden mejorar con una inyección de 24 segundos GlobalFiler™ Express 25 ciclos con una inyección de 15 segundos para sangre y saliva en las tarjetas FTA, así como muestras de hisopo. La amplificación implicó una perforación de 1,2 mm de saliva o sangre en FTA y 3 µl de ADN del hisopo. Estas muestras pueden mejorar con una inyección de 30 segundos (Maldonado, Skillman, Zeffer, Kuyper, & Staton, 2010) .

**Validación y resultados preliminares del kit de AmpFISTR® Minifiler™ en el Laboratorio de Genética Forense de la DIJIN, Policía Nacional de Colombia.**

Del mismo modo en el 2011 el laboratorio de la Dirección de Investigación Criminal e Interpol (DIJIN) de la Policía Nacional implementó la utilización del kit

AmpFI STR<sup>®</sup> Minifiler<sup>™</sup> PCR Amplification de AppliedBiosystems con el fin de ayudar en la resolución de casos donde se estudiara un gran fragmento de ADN.

Donde se evaluó las altura de picos controles utilizando dos analizadores genéticos ABI Prism310<sup>®</sup> y se emplearon dos volúmenes finales de reacción de PCR. Se evaluará la sensibilidad y precisión utilizando muestras de concentraciones entre 0,1 ng/μL hasta 0,006 ng/μL también se valoró la reproducibilidad comparando 10 muestras donde se incluyó sangre a diferentes concentraciones, saliva, prendas, evidencias traza, pelo, hueso y diente. Una vez realizada la validación se hicieron pruebas con muestras de 5 casos que habían presentado concentraciones bajas de ADN y amplificaciones parciales utilizando el kit AmpFI STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup>, como resultados se pudo verificar que la concentración ideal para el uso del kit AmpFI STR<sup>®</sup> Minifiler<sup>™</sup> está en un rango entre 0,05 y 0,075 ng/μl de ADN. Se encontró que es posible obtener resultados en muestras con concentraciones de 0,02 ng/μl; cuando la concentración es inferior, los resultados no son reproducibles. En 4 muestras previamente genotipificadas con el kit AmpFI STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup>, se amplió el número de marcadores obtenidos en más del 48% con la utilización del kit AmpFI STR<sup>®</sup> Minifiler<sup>™</sup> y se pudo llegar a la probabilidad exigida por la ley colombiana y de acuerdo con los resultados obtenidos en esta validación, las muestras procesadas utilizando el kit comercial Minifiler, bajo las condiciones descritas de concentración, amplificación y análisis, mostraron resultados precisos y reproducibles en el 100% en las muestras analizadas (Acevedo, Borda, & Bocanegra, 2011).

#### **Validación interna de Applied Biosystems<sup>®</sup> Globalfiler<sup>™</sup> express PCR amplification kit.**

Por ultimo en el 2012 se describe que la calidad de un kit de amplificación de ADN afecta directamente a la recuperación de los resultados de tipificación de ADN, lo que hace que estos

kits sean evaluados antes de ser implementados. Debido a los beneficios del Applied Biosystems® GlobalFiler™ Express Kit, se realizó una validación interna en el Laboratorio de Delitos de Policía del Condado de St. Louis para permitir que el Kit GlobalFiler™ Express sea implementado en el flujo de trabajo para muestras de una sola fuente. Se determinó la preparación de la muestra, el tiempo de inyección, el umbral analítico y el umbral estocástico para optimizar el protocolo para el análisis de las tarjetas FTA y los hisopos bucales. Durante esta validación, se completaron los estudios de sensibilidad, precisión, contaminación, reproducibilidad, concordancia y mezcla para verificar que el kit produjera resultados confiables y reproducibles.

Se utilizó una punta de Harris Micro Punch™ de 1.2 mm para probar todas las tarjetas de sangre FTA. Para asegurar que la herramienta no fuera una fuente de contaminación, se tomaron dos perforaciones "en blanco" después de cada muestra para que la segunda perforación "en blanco" mostrara si la contaminación se llevó a la siguiente muestra durante el tratamiento de casos. Las perforaciones se pusieron en la cantidad óptima dada por PrepNGo™ Buffer (20 µl), y se tomaron a través del flujo de trabajo de laboratorio. Esto se realizó para tres muestras dando un total de 6 perforaciones 'en blanco'. Dónde se sometieron a 4 temperaturas diferentes durante 20 min los resultados de amplificación se compararon con los tiempos de incubación.

Los estudios realizados en esta validación con el kit de Amplificación GlobalFiler™ Express produciría resultados óptimos en función del costo y del tiempo.

### **III.JUSTIFICACION**

El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la sensibilidad de los parámetros del Kit GlobalFiler™ PCR Amplification de Applied Biosystems en muestras hemáticas en papel FTA mediante modificaciones de reducción de volumen, números de ciclos de amplificación y tiempos de extensión con respecto a las condiciones recomendadas por el fabricante.

Esto puede ser útil para que en el laboratorios de genética realice ensayos de validación interna para parámetros de amplificación de ADN que sean adecuados para el mismo es de suma importancia para la obtención de resultados confiables. La realización de una validación interna permite detectar atributos y limitaciones que son críticos para la interpretación de resultados. Además permite dar pausa a elegir nuevas estrategias en el uso del kit GlobalFiler™ mejorando costos y tiempo de obtención de resultados en genética forense para lograr una mejor precisión en los resultados (Maldonado, Skillman, Zeffer, Kuyper, & Staton, 2010).

Los estudios realizados en esta validación con el kit de Amplificación GlobalFiler™ produciría resultados óptimos en función del costo y del tiempo.

### **IV.HIPOTESIS**

La validación para los parámetros de amplificación con el Kit GlobalFiler™ en filtro FTA con muestras sanguíneas a un volumen de 5 y 10 µl de solución mix a 22 y 24 ciclos son las condiciones óptimas para su uso en el laboratorio permitiendo mejorar costos y tiempo de obtención de resultados en genética forense; en comparación con lo establecido por el fabricante de 25 µl y 24 ciclos.

## V.OBJETIVO

### 5.1 Objetivo General

Evaluar la sensibilidad de los parámetros del Kit GlobalFiler™ PCR Amplification de Applied Biosystems en muestras hemáticas en papel FTA mediante modificaciones de reducción de volumen, números de ciclos de amplificación y tiempos de extensión con respecto a las condiciones recomendadas por el fabricante.

### 5.2 Objetivo Específico

1. Realizar la validación del proceso de purificación y amplificación de muestras hemáticas en papel FTA con el Kit GlobalFiler™ PCR Amplification de AppliedBiosystems, utilizando los ensayos de reducción de volumen establecidos en el laboratorio: 10 y 5 µl a 20 y 22 ciclos.

2. Realizar una comparación entre los ensayos propuestos (10 y 5 µl, 20 y 22 ciclos), con las condiciones establecidas por el fabricante: 25 µl y 24 ciclos.

3. Verificar los parámetros de los ensayos que de acuerdo a la validación se consideren cómo óptimo para su uso en el laboratorio, utilizando muestras reales cuyos resultados sean previamente conocidos.

## V1.METODOLOGIA

### 6.1. Materiales y Equipos

#### 6.1.1. Equipos e Instrumentos

- ✓ Harris Micro Punch 1.2 mm
- ✓ Piceta de alcohol
- ✓ ThermoMixer
- ✓ Micropipeta 100µl-1000µl
- ✓ Puntas con filtro
- ✓ Tubos eppendort

- ✓ Tubos para PCR
- ✓ Termociclador Geneamp® PCR System 9700
- ✓ Analizador Genético ABI Prism 3500
- ✓ GeneMapper ID-X v1.4 Software
- ✓ Algodón
- ✓ Encendedor

### **6.1.2. Reactivos**

- ✓ Agua destilada
- ✓ Reactivo FTA
- ✓ Kit GlobalFiler™ PCR Amplification. Número de lote: 1311005
- ✓ Polímero. Número de lote: 1311062
- ✓ Buffer ánodo. Número de lote 1311145
- ✓ Buffer cátodo. Número de lote: 1312170
- ✓ Escalera alélica. Número de lote: 1312019
- ✓ Arreglo capilar. Serié 07
- ✓ Formamida. Número de lote: 1312045

### **6.1.3. Sustancia de referencia**

Muestra de referencia en papel FTA (sangre control con perfil conocido)

## **6.2. Procedimiento**

### **6.2.1. Rotulación de la muestra**

Se etiquetaron tubos eppendorf de 1.5 ml rotulando la tapa con la clave de identificación de la muestra cómo se puede observar en la sección anexo tabla (9).



### **6.2.2. Obtención de la muestra**

a. Se procedió a calentar la punta del Harris Micro-Punch con la flama azul de un encendedor para eliminar rastros de ADN, esperar aproximadamente 10 segundos, y realizar de 3 a 5 perforaciones de 1.2 mm sobre la muestra sanguínea depositada en el papel FTA.

### **6.3. Procesamiento de la muestra**

a. Se colocó la perforación de la muestra en el tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado, colocar 400  $\mu$ l del reactivo de purificación FTA e incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer después decantar con sumo cuidado el reactivo de purificación FTA.

b. Se colocó 800  $\mu$ l de agua destilada libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer después se decantó con cuidado el agua destilada (repetir nuevamente estos pasos) y se colocó los tubos en el thermomixer a una temperatura entre 35° C y 40° C o a temperatura ambiente hasta que estos se hayan secado, la muestra está lista para amplificarse con el protocolo de PCR, utilizando sólo un fragmento de FTA, los fragmentos de FTA una vez secos se podrán almacenar a temperatura ambiente o en congelación, cuadro comparativo de ensayos realizados por el proveedor & ensayos propuestos por el laboratorio, se puede observar en la sección de anexo tabla (11).

### **6.4. Condiciones de amplificación**

Se utilizaron tres volúmenes de mezcla de reacción (25 $\mu$ l, 10 $\mu$ l y 5 $\mu$ l), y tres ciclos diferentes para la amplificación (20, 22 y 24 ciclos) y dos tiempos de extensión (10 min y 40 min), como se observa en la sección de anexo tabla (9 y 10).

Todas las muestras se analizaron realizando corridas electroforéticas en el analizador genético 3500.

## 6.5. Verificación

La verificación es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método y consiste en evaluar el desempeño del mismo para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación (Reyes Ramirez).

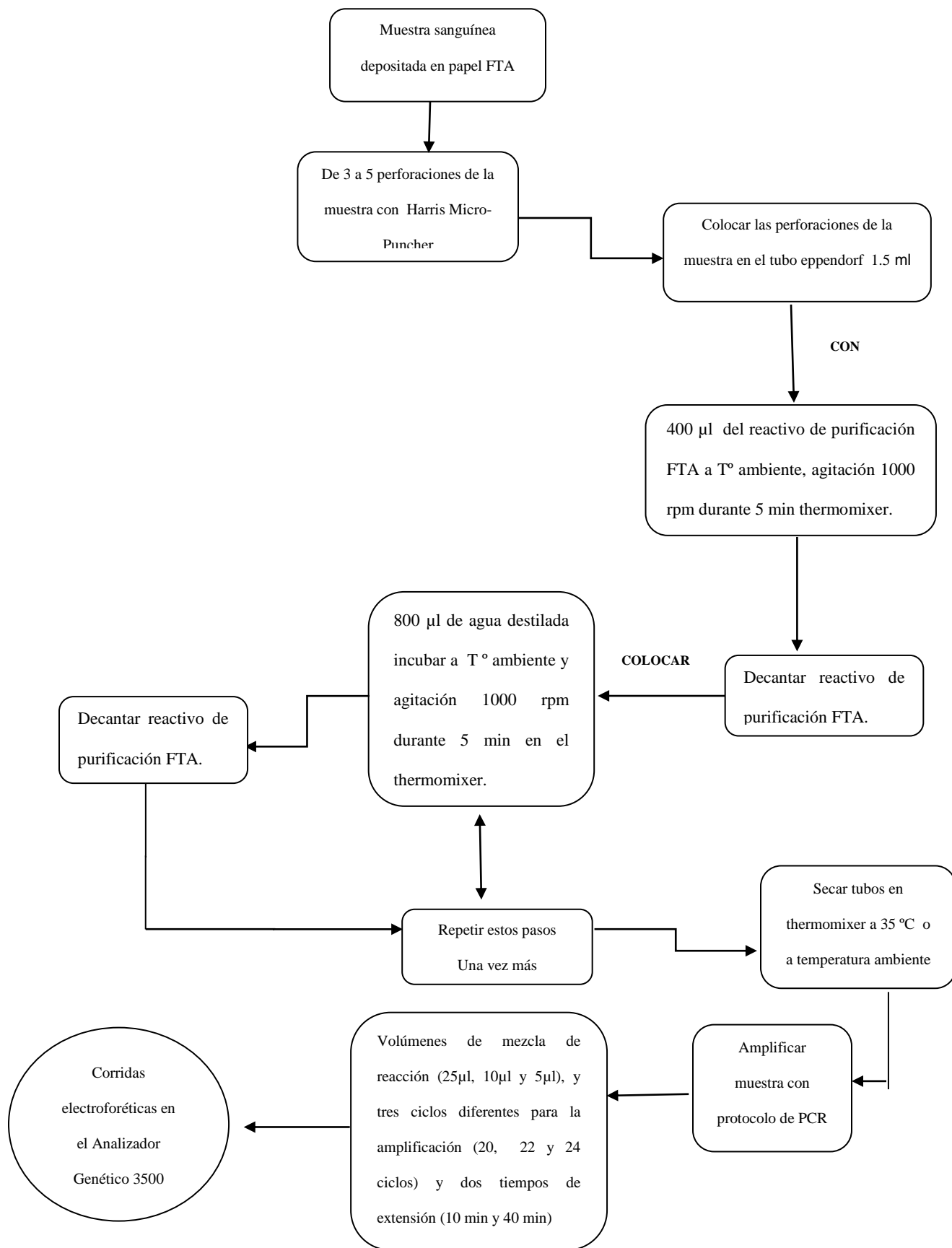
Para la verificación de los parámetros de la validación, se procesaron muestras ya conocidas y los controles establecidos en el laboratorio.

**Tabla 1.**  
*Tabla de Verificación.*

	MUESTRA SANGUINEA EN PAPEL FTA	CONTROL INTERNO
1	YMP	346/16
2	GCH	346/16
3	NRG	346/16
4	CPF	215/16
5	DPV	215/16
6	TZO	432/16
7	GAL	432/16
8	C+RQV	C+
9	C+RQV	C+
10	C+GPS	C+
11	C+GPS	C+
12	BLANCO DE EXTRACIÒN	

Muestras reales para verificar parámetros de validación.


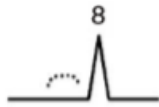
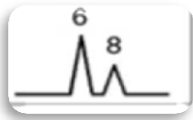


## VII. DIAGRAMA DE FLUJO



## VIII. RESULTADOS

Tras el análisis que se lleva a cabo por el software, se separan los picos en función al color que se han establecido en el laboratorio de manera interna para el análisis de estos datos dando lugar a distintos electroferogramas a continuación se describe el significado de cada color:

**Tabla 2.**  
*Código de colores*

COLORES DE LA ZONA	DINTINTOS PICOS	SIGNIFICADO DE LOS PICOS
ZONA VERDE		Ambos alelos están presentes
ZONA BLANCA		Representa perdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia
ZONA AMARILLA		Ambos alelos presentes, pero hay desbalance de picos
ZONA GRIS		Error en la electroforesis
ZONA ROJA		No hay amplificación

Imágenes de picos para su lectura correcta

Por ultimo cada electroferograma se pasa a una tabla señalando cada pico diferente de un color para que sea más fácil su interpretación y comparación con otros ensayos.

**12.1. GlobalFiler 20 Ciclos a 10 min de Extensión**

Para muestras amplificadas a 20 ciclos y 10 minutos de extensión, a un volumen final de 25µl, se observaron pocos marcadores amplificados, y una pérdida alélica. En el volumen final de 10 µl se presentó mayor número de marcadores amplificados pero todas las muestras presentan perfiles parciales, con menos del 50 por ciento de los datos. En 5 µl de volumen total todos los marcadores fueron amplificados de forma óptima, sin desbalance de picos ni alelos extra.

**Tabla 3.**  
*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 20 ciclos durante 10 min de extensión*

GLOBAL FILER 20 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																								
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3															190									
Amp 4																								
Amp 5																								
GLOBAL FILER 20 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																								
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3									177															
Amp 4								175																
Amp 5																								
GLOBAL FILER 20 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																								
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa pérdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, los pies de columnas representan los diferentes volúmenes finales de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.

## 12.2. GlobalFiler 20 Ciclos a 40 min de Extensión

Para muestras amplificadas a 20 ciclos 40 minutos de extensión a un volumen final de 25 µl se observaron pocos marcadores amplificados, menos que en el ensayo anterior (20 ciclos y 10 minutos de extensión), y tres pérdidas alélicas; para el volumen final de 10µl se observó un mayor número de marcadores amplificados teniendo únicamente dos perfiles parciales con más del 80% de los marcadores presentes. En 5 µl de volumen total todos los marcadores fueron amplificados de forma óptima, sin desbalance de picos ni alelos extra.

**Tabla 4.**

*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 20 ciclos durante 40 min de extensión*

GLOBAL FILER 20 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																									
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CS F1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2													178	176											
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									
GLOBAL FILER 20 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																									
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CS F1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																					190				
Amp 5																									
GLOBAL FILER 20 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																									
	D3S 1358	vWA	D16S 539	CS F1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa pérdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, la cabeza de columnas representan los diferentes volúmenes finales de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.

### 12.3. GlobalFiler 22 Ciclos a 10 min de Extensión

Para muestras amplificadas a 22 ciclos y 10 minutos de extensión a un volumen final de 25 µl, se observan marcadores sin resultados y pérdidas alélicas. En volumen final de 10µl se observó de manera general buenos resultados aunque existen marcadores no amplificados y no hubo un buen corrimiento electroforético en uno de los ensayos. En 5 µl de volumen total todos los marcadores fueron amplificados de forma óptima, sin desbalance de picos ni alelos extra.

**Tabla 5.**

*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 22 ciclos durante 10 min de extensión*

GLOBAL FILER 22 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																			180						
Amp 3																									
Amp 4					187						188														
Amp 5																									
GLOBAL FILER 22 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									
GLOBAL FILER 22 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSION																									
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa pérdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, zona gris: error en electroforesis, la cabeza de columnas representan los diferentes volúmenes final es de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.

## 12.4. GlobalFiler 22 Ciclos a 40 min de Extensión

Para muestras amplificadas a 22 ciclos y 40 minutos de extensión a un volumen final de 25 µl se observan resultados similares que en el punto anterior pero con un mayor número de marcadores sin resultados. En volumen de 10µl se observó de manera general buenos resultados aunque existen marcadores no amplificados. En 5 µl de volumen total todos los marcadores fueron amplificados de forma óptima, sin desbalance de picos ni alelos extra.

**Tabla 6.**

*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 22 ciclos durante 40 min de extensión.*

GLOBAL FILER 22 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																								
	D3S1358	.JWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2											203						188							
Amp 3											196													
Amp 4																								
Amp 5																								
GLOBAL FILER 22 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																								
	D3S1358	.JWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																				179				
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								
GLOBAL FILER 22 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSION																								
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																								
	D3S1358	.JWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa pérdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, la cabeza de columnas representan los diferentes volúmenes final es de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.



### 12.5. GlobalFiler 24 Ciclos a 10 min de Extensión

Para muestras amplificadas a 24 ciclos 10 minutos de extensión a un volumen final de 25 µl, se observó disminución considerable de marcadores no amplificados, no obstante en dos de las muestras se observaron perfiles parciales con menos del 50%, y se tuvo también una pérdida alélica. Así mismo se observó un número grande de marcadores sin resultados para el volumen final de 5 µl, contrario a lo que se había observado en los otros ensayos, por lo anterior se presentan perfiles parciales en todas las muestras. Para 10 µl de volumen final se observa los mejores resultados en este ensayo, aun cuando se presentan unos pocos datos no amplificados y presencia de picos extra a los alelos verdaderos.

**Tabla 7.**

*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 24 ciclos durante 10 min de extensión.*

GLOBAL FILER 24 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSIÓN																								
PCR VOLUMEN 25 µL																								
	D3S 1358	AWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								177
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								
GLOBAL FILER 24 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSIÓN																								
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																								
	D3S 1358	AWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								
GLOBAL FILER 24 CICLOS A 10 MIN DE EXTENSIÓN																								
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																								
	D3S 1358	AWA	D16S 539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S 1179	D21S 11	D18S 51	DYS 391	D2S 441	D19S 433	TH01	FGA	D22S 1045	D5S 818	D13S 317	D7S 820	SE33	D10S 1248	D1S 1656	D12S 391	D2S 1338
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32,2	14,15	10,10	10,14	16,16,2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17,3,18,3	20,20	23,25
Amp 1																								
Amp 2																								
Amp 3																								
Amp 4																								
Amp 5																								

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa perdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, zona amarilla: Ambos alelos presentes pero hay desbalance de picos, la cabeza de columnas representan los diferentes volúmenes final es de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.

### 12.6. GlobalFiler 24 Ciclos a 40 min de Extensión

Para muestras amplificadas a 24 ciclos 40 minutos de extensión a un volumen final de 25 µl y 10 µl se observaron los mejores resultados para ambos ensayos, teniendo la totalidad de perfiles completos a 10 µl y solo algunas no amplificaciones a 25 µl. Sin embargo, para el volumen final de 5 µl se observaron resultados parecidos al ensayo anterior que en conjunto no presentaron amplificación en cuanto a este volumen reducido.

**Tabla 8.**  
*Relación de marcadores específicos del kit GlobalFiler™ a 24 ciclos durante 10 min de extensión.*

GLOBAL FILER CICLOS 24-40 MIN DE EXTENSIÓN																									
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	DSS818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17.3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									
GLOBAL FILER 24 CICLOS A 40 MIN DE EXTENSIÓN																									
PCR VOLUMEN TOTAL 10 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	DSS818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17.3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									
GLOBAL FILER CICLOS 24-40 MIN DE EXTENSIÓN																									
PCR VOLUMEN TOTAL 5 µL																									
	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	YINDEL	AMELOG	D8S1179	D21S11	D18S51	DYS391	D2S441	D19S433	TH01	FGA	D22S1045	DSS818	D13S317	D7S820	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	
	15,16	16,18	10,10	12,12	8,12	2	X,Y	11,15	30,32.2	14,15	10,10	10,14	16,16.2	6,7	21,22	15,16	11,13	9,10	9,10	18,19	13,14	17.3,18.3	20,20	23,25	
Amp 1																									
Amp 2																									
Amp 3																									
Amp 4																									
Amp 5																									

Zona verde: ambos alelos están presentes, zona blanca: representa perdida alélica, el valor de las unidades de fluorescencia relativas se representan en cada cuadro, zona roja: no amplificación, la cabeza de columnas representan los diferentes volúmenes final es de mix de reacción, rosa 25 µl de volumen final, azul 10 µl de volumen final, negro 5 µl de volumen final.

## IX.DISCUSIÒN

Los ensayos realizados para la validación interna en el laboratorio de genética forense para el kit GlobalFiler™ PCR Amplification demuestran que es posible obtener muestras sanguíneas en FTA procesadas con perfiles completos utilizando el kit GlobalFiler™ PCR Amplification con un ensayo propuesto de 5 µl y 22 ciclos. La utilización de estos volúmenes nos permite la obtención de electroferogramas completos, sin pérdida alélica, sin desbalance de picos y sin presencia de picos extras a los alelos verdaderos dando resultados precisos y reproducibles en las muestras analizadas. A diferencia de los volúmenes que se establecen en la guía de usuario del kit GlobalFiler™ PCR Amplification de la casa comercial para muestras sanguínea en FTA (25 µl y 24 ciclos).

Los resultados obtenidos para el análisis de muestras sanguínea en tarjeta FTA dentro del laboratorio de Genética se determinó que el ensayo de 22 ciclos y 10 minutos de extensión y a un volumen final de reacción de 5µl es el que más conviene como se mencionó anteriormente debido a que se optimiza el costo de la prueba ya que un Kit GlobalFiler™ debido a que tiene un precio aproximado de \$828,180.19 pesos el cual alcanza para 200 reacciones en virtud de que podemos procesar 5 muestras con el volumen total recomendado por el fabricante para el análisis de una sola muestra (25 µl) el cual con la validación alcanza para procesar 1000 muestras. Además también se optimiza el tiempo de la prueba ya que se puede procesar en 10 minutos a 22 ciclos a diferencia del proveedor que marca 24 ciclos.

Los protocolos que se realizan en el laboratorio de genética forense cumplen con los requerimientos de acreditación de normas internacionales tal como la NOM ISO/IEC 17025 de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y de Calibración (Grupo Empresarial ACCE, Norma ISO, 2005).

Por lo que se demuestra la importancia de llevar a cabo la validación interna en los laboratorios de genética forense en relación al Kit Globalfiler™ de papel FTA con muestra sanguínea para la cuantificación de ADN.

Con base en la bibliografía y con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede comparar y observar su relevancia en el artículo Validación Interna y análisis comparativo de PowerPlex® Fusion y el GlobalFiler™ Express Amplification Kits para amplificación directa se realiza una validación con el objetivo de demostrar que estos kits comerciales producen resultados fiables y robustos, además de identificar un parámetro de ciclo térmico y tiempo de inyección simple para ambos kits utilizando tarjetas FTA con muestra sanguínea, la comparación entre dos de los más novedosos kits de PCR directa como son el PowerPlex® Fusión y los kits de amplificación GlobalFiler™ Express demostró que ambos producen resultados robustos y fiables estableciendo parámetros para cada kit (Maldonado, Skillman, Zeffer, Kuyper, & Staton, 2010).

Ya que se establece la amplificación directa para eliminar la cuantificación de ADN de muestras de referencia y la validación para realizar estudios de repetibilidad, precisión y reproducibilidad.

En un estudio similar Shanna K. Saunders en el 2012 realizó la Validación Interna de Applied Biosystems® GlobalFiler™ Express PCR Amplification kit utilizando la punta de Harris Micro Punch de 1.2 mm para probar tarjetas de papel FTA con muestra sanguíneas realizando estudios de sencibilidad, precisión, reproducibilidad para demostrar que el kit da resultados confiables, las perforaciones se colocaron con la cantidad óptima dada por PrepNGo buffer de 20 µl esto se realizó en 6 muestras, donde se sometieron a 4 temperaturas diferentes

durante 20 minutos este estudio realizado permitira que la validaciòn con el kit GlobalFiler Express producira resultados optimos en costo y tiempo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede comparar con el artículo anterior ya que en los dos se realizan perforaciones de 1.2 mm de papel FTA con muestra sanguínea para eliminar la cuantificación de ADN es decir que existe una correlación entre estudios ya realizados que pretenden demostrar la calidad de los Kits comerciales mediante la validación interna para obtener resultados confiables, reproducibles, optimizar costos y ahorrar tiempo siguiendo procedimientos similares al utilizar una muestra sanguínea en tarjeta FTA con perforaciones de 1.2 mm donde las muestras se someten a distintos ciclos y temperaturas propuestos por cada laboratorio para realizar la validación interna se puede observar el anexo de la tabla 11 (Saunders, 2012) .

## **X.CONCLUSIÒN**

La validación interna de kit GlobalFiler™ PCR Amplification es importante para obtener resultados confiables, reproducibles, optimizar costos y ahorrar tiempo siguiendo procedimientos similares al utilizar una muestra sanguínea en tarjeta FTA.

Se establece que el ensayo a 22 ciclos, 10 minutos de extensión y a un volumen final de reacción de 5µl es el más conveniente para el análisis de muestras sanguínea en tarjeta FTA dentro del laboratorio de Genética debido a que se optimiza el costo y tiempo.

## **XI.BIBLIOGRAFIA**

1. Acevedo, M., Borda, O., & Bocanegra, B. (11 de Marzo de 2011). Validación y resultados preliminares del kit de AmpFISTR® Minifiler™ en el Laboratorio de Genética Forense de la DIJIN, Policía Nacional de Colombia. *Cuad Med Forense*, 17(2), 77-81.
2. Almacenamiento/Papel FTA Whatman. (2014). Kit FTA Para Recogida, Transporte, Almacenamiento y Extracción De ADN a Temperatura Ambiente.
3. Anigen. (2014). Validación de Fragmentos STR's. PUEBLA.
4. Arbeláez García, C. A. (2009). Sistema del Grupo Sanguineo ABO. *Medicina y laboratorio*, Medica Colombiana.
5. Butler. (2005). *Forensic DNA Typing*. Estados Unidos: Elsevier.
6. Castro del Barrio, R. (2016). *La Prueba de ADN en el Proceso Penal: Analisis de Sencibilidad de los Calculos Probabilisticos*. Madrid.
7. Cols, & A. S. (s.f.). *Genética Forense. Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. *Nature* 290, 457-465.
8. Greif, G. (2004). *Reaccion en Cadena de la Polimerasa*. Unidad de Biologia Molecular. Institut Pasteur Montevideo.
9. Grupo Empresarial ACCE, Norma ISO. (2005). *NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. Mexico.
10. Juvenal, G. J., Gangitano, D. A., & Padula, R. A. (2001). *ADN y Analisis Forense*. CNA.
11. Luna Polo Castillo, T. G. (2013). *Perfiles Geneticos del Cromosoma X y su Utilidad en el Area Forense*.

12. Macias Peña, R. (2010). "Por tu Hermano el Hombre". Banco de Sangre Universitario.
13. Maldonado, B., Skillman, J., Zeffler, J., Kuyper, L., & Staton, P. (2010). Validación Interna y análisis comparativo de PowerPlex® Fusion y el GlobalFiler™ Express Amplification Kits para amplificación directa. Forensic Science.
14. Mis Blogs. (Jueves 24 de Mayo de 2012). Obtenido de <http://geneticaforence.blogspot.com/2012/05/muestras-dubitadas-e-indubitadas>
15. Prieto L., M. M. (2014). Valoración e Interpretación de Perfiles Genéticos Problemáticos. Boletín Galego de Medicina Legal y Forense.
16. Rangel Tadeo, M. A. (2013). La Genética Forense en México su Aplicación Legal y el Banco de Datos Genéticos. Mexico D.F.
17. Reyes Ramirez, I. (s.f.). Temas Selectos de Calidad en Serología (aplicación en el banco de sangre). Validación y Verificación de métodos de examen cuantitativos. entidad mexicana de acreditación a.c.
18. Rodríguez Carlin, C., Rodarte Murguía, B., Monter Rosales, M., Coss Rojas, A. C., Castañeda Sortibrán, A., & Rodríguez Arnaiz, R. (2010). Genética Forense. Revista Fuente Año 2, 31-35.
19. Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas de su Invención. CIENCIA UANL, 1-13.
20. San Miguel, E. (2011). Validación De Técnicas Analíticas. Transferencia a Los Laboratorios Regionales. Madrid: Actividades De Laboratorios De Referencia.
21. Saunders, Shanna K. (2012). Validación interna de Applied Biosystems® Globalfiler™ express PCR amplification kit, (31).

22. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Mayo-Agosto de 2013).  
Fundamentos De La Reacción en Cadena De La Polimerasa ( PCR) y De La PCR En  
Tiempo Real. *Tecnología en Salud*, 2(2), 70-78



## XII.ANEXOS

Se utilizaron tres Volúmenes de mezcla de reacción (25µl, 10µl y 5µl), y tres ciclos diferentes para la amplificación (20, 22 y 24 ciclos) y dos tiempos de extensión (10 min y 40 min), como se observa a continuación (tablas 9 y10).

**Tabla 9.**

*Análisis de muestras en diferentes ciclos de extensión y tiempo.*

Numero de muestra	Nombre de la muestra	Tipo de muestra	Cantidad y tamaño de la muestra (mm)	Volumen de mix preparada para cada grupo de muestras (µL)	Volumen de mix agregada cada muestra (µL)	Volumen de buffer TE para alcanzar cantidad total
1	ROJO 1	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20	50	10	15
2	ROJO 2	Perforación FTA de Sangre	perforación de 1.20		10	15
3	ROJO 3	Perforación FTA de Sangre	perforación de 1.20		10	15
4	ROJO 4	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		10	15
5	ROJO 5	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		10	15
6	AZUL 1	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20	25	5	7.5
7	AZUL 2	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		5	7.5
8	AZUL 3	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		5	7.5
9	AZUL 4	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		5	7.5
10	AZUL 5	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		5	7.5
11	NEGRO 1	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20	10	2	3
12	NEGRO 2	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		2	3
13	NEGRO 3	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		2	3
14	NEGRO 4	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		2	3
15	NEGRO 5	Perforación FTA de Sangre	1 perforación de 1.20		2	3
<b>TOTAL</b>	15 muestras	--		85 µL		127.5 MI

Para el análisis de muestras a 20 ciclos 10 minutos de extensión, 22 ciclos 10 minutos de extensión, 24 ciclos 10 minutos de extensión, 20 ciclos 40 minutos de extensión, 22 ciclos 40 minutos de extensión y 24 ciclos 40 minutos de extensión.

**Tabla 10.***Análisis de muestras en diferentes ciclos de extensión y tiempo.*

Incubación Inicial	20/22/24 Ciclos		Extensión Final	Hold Final
	Desnaturalización	Alineación/Extensión		
Hold	Ciclo		Hold	Hold
95°C 1 min	94°C 10 seg	59°C 1 min 30 seg	60°C 10 min	4°C ∞

Parámetros de Amplificación del Kit GlobalFiler™ de AppliedBiosystems

**Tabla 11.***Cuadro comparativo.*

<b>PAPEL FTA (PROVEEDOR)</b>	<b>ENSAYOS LABORATORIO</b>
Colocar el disco en un tubo PCR y lavar 3 veces con reactivo de purificación - eliminar el reactivo después de cada lavado	Colocar 400 µl del reactivo de purificación FTA e incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer. Decantar
Lavar 2 veces con tampón TE-1 (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8) y eliminar el tampón utilizado después de cada lavado	Lavar 2 veces con 800 µl de agua destilada libre de nucleasas e incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer. Decantar
<b>KIT GLOBALFILER™ (PROVEEDOR)</b>	<b>ENSAYOS LABORATORIO</b>
24 ciclos a 40 minutos de extensión y a un volumen final de reacción de 25µl	22 ciclos a 10 minutos de extensión y a un volumen final de reacción de 5µl

Ensayos realizados por el proveedor &amp; ensayos propuestos por el laboratorio