



Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales.

Sara Helena Cardona Toro

Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo

Asesora

Yeny Cecilia Posada Posada, Magíster (MSc) en Investigación Criminal y Esp. Ciencias
Forenses: Bioanálisis Forense

Coasesor

Belfran Alcides Carbonell, Magíster (MSc) en Odontología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biología
Medellín, Antioquia, Colombia
2022

Cita	(Cardona Toro, 2022)
Referencia	Cardona Toro, S. H. (2022). Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales. [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación Identificación Genética (IdentiGEN).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Adriana Echavarría Isaza.

Jefe departamento: Ana Esperanza Franco Molano.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado, en primera instancia a mi madre y a mi tío Gustavo, quienes estuvieron en cada etapa de mi vida universitaria, apoyándome, aconsejándome, desvelándose conmigo; seguidamente, a mis compañeros de clases y mis maestros, que me brindaron las herramientas necesarias para llegar hasta aquí y, por último, pero no menos importante, al Alma Mater, que fue mi segundo hogar durante estos años de aprendizaje y crecimiento tanto profesional como personal.

Agradecimientos

Agradezco a mis maestros, por la paciencia y dedicación que tuvieron conmigo, a los docentes e investigadores del laboratorio IdentiGEN, que me acompañaron en mi proceso de prácticas y pusieron a mi disposición sus conocimientos, especialmente Yeny Posada y Belfran Carbonell, mis asesores, quienes estuvieron conmigo en cada momento de este proyecto y me ayudaron a afianzar mi amor por las ciencias forenses, quienes se convirtieron en amigos y espero (para un futuro cercano) en colegas. Gracias a Diego Bernal, por su apoyo desinteresado en mi proyecto y por las emocionantes historias que me “encarretaron” con los muertitos.

Gracias a mis amigos y a todas las personas que fueron dejando su marca en mi camino, en especial Andrea, pues sin ella no habría pasado del 4to semestre. Agradezco a mi familia, particularmente a mi mamita Adelfa que, aunque nunca entendió muy bien que es y para qué sirve lo que estudio, siempre me apoyó y alentó a seguir adelante con mis sueños.

¡Muchísimas gracias a todos!

Tabla de contenido

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
1. Objetivos	13
1.1 Objetivo general.....	13
1.2 Objetivos específicos	13
2. Marco teórico	14
3. Metodología	17
4. Resultados	22
4.1 Estandarización de la extracción de ADN en tejido mineralizado (huesos y dientes).....	22
4.3 Ensayos de validación en piezas dentales:.....	28
4.4 Extracción de ADN a través del método de perlas magnéticas (ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit).....	33
5. Discusión.....	35
5.1. Estandarización.....	35
5.2 Validación	35
5.3 Dificultades en la aplicación del método.	36
6. Conclusiones	37
6.1 QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN.....	37
6.2 ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit	38
7. Recomendaciones.....	39
Referencias	40
Anexos.....	43

Lista de tablas

Tabla 1. Criterios de aceptación para la validación.....	21
Tabla 2. Estandarización del proceso de extracción de ADN en fragmentos de hueso. [ADN] medida por fluorometría en ug/mL.	23
Tabla 3. Blanco de reactivos, medido en URF con diez réplicas.	24
Tabla 4. Lectura de muestra de control interlaboratorio (fragmento de hueso), medido en pares de bases, con diez réplicas.....	25
Tabla 5. Lectura de muestra de control positivo 2800M, medido en pares de bases con diez réplicas.	26
Tabla 8. Blanco de reactivos, medido en URF con diez réplicas.	28
Tabla 9. Lectura de muestra de control Interlaboratorio (fragmento de hueso), medido en pares de bases con diez réplicas.	29
Tabla 10. Lectura de muestra de control positivo 2800M, medido en pares de bases con diez réplicas.	30
Tabla 11. Lectura de una muestra de diente, medido en pares de bases con cinco réplicas. Realizado, por analista (Tiempo 1).	31
Tabla 12. Lectura de una muestra de diente, medido en pares de bases con cinco réplicas.	32
Tabla 13. Parámetros de evaluación y conclusiones de los ensayos de validación para restos óseos.	37
Tabla 14. Parámetros de evaluación y conclusiones de los ensayos de validación para piezas dentales.....	38
Tabla 6. Lectura de una muestra de resto ósea, medido en pares de bases con cinco réplicas. Realizado por analista en t1	43
Tabla 7. Lectura de una muestra de resto óseo, medido en pares de bases con cinco réplicas. Realizado por analista en t2	44

Lista de figuras

Ilustración 1. Esquema de estandarización para la extracción de ADN en tejidos mineralizados	17
Ilustración 2. Gráfico de dispersión del CV por marcador para la prueba de reproducibilidad. ..	27
Ilustración 3. Gráfico de dispersión del CV por marcador, para la prueba de repetibilidad	27
Ilustración 4. Electroferograma obtenido a partir de la extracción de ADN con el método de perlas magnéticas en piezas dentales temporales	33
Ilustración 5. Electroferograma obtenido a partir de la extracción de ADN con el método de perlas magnéticas en piezas dentales permanentes	34

Siglas, acrónimos y abreviaturas

APA	American Psychological Association
Cms.	Centímetros
mL	Mililitros
ug	Microgramos
UBPD	Unidad de Búsqueda de Personas Dadas por Desaparecidas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ONAC	Organismo Nacional de Acreditación de Colombia
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
STR	Short Tandem Repeats
URF	Unidad Relativa de Fluorescencia
UdeA	Universidad de Antioquia
ng	Nanogramos
uL	Microlitros
PCR	Polimerase Chain Reaction
LD	Limite de detección
LC	Limite de cuantificación
SDS	Dodecilsulfato sódico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

Resumen

El papel de los laboratorios forenses en la identificación de víctimas es esencial por razones humanitarias, pero también para las investigaciones civiles o penales y para lograr la individualización de un cadáver; para éste propósito se apoyan en diferentes metodologías, que se emplean de forma interdisciplinaria a través de ciencias como la antropología, la odontología, la dactiloscopia, la radiología y/o la genética forense, entre otras; pues en los casos donde no es posible realizar la identificación del cuerpo a través de los métodos clásicos, es necesario recurrir al análisis de ADN proveniente de fuentes poco “convencionales” como huesos o piezas dentales.

Validar los métodos de extracción de ADN ante el ONAC, es un requisito para los laboratorios que buscan prestar servicios de filiación e identificación humana. En IdentiGEN, se realizó la estandarización y validación del método QIAquick PCR Purification Kit -QIAGEN para su uso en tejidos mineralizados. Se hicieron ensayos de extracción, cuantificación, amplificación de ADN y electroforesis capilar para asegurar la eficacia del método. Se tipificaron de manera exitosa las piezas dentales y fragmentos de hueso utilizados, obteniendo perfiles de alta calidad y confiabilidad, que soportan la eficacia y exactitud del método para su uso previsto.

Palabras clave: extracción de ADN, tejidos mineralizados, identificación, validación de métodos.

Abstract

The role of forensic laboratories in the identification of victims is essential for humanitarian reasons, but also for civil or criminal investigations and to achieve the individualization of a corpse; for this purpose they rely on different methodologies, which are used in an interdisciplinary way through sciences such as anthropology, dentistry, dactyloscopy, radiology and/or forensic genetics, among others; but in cases where it is not possible to identify the body through classical methods, DNA analysis from unconventional sources such as bones or teeth is necessary.

Validation of DNA extraction methods by ONAC is a requirement for laboratories seeking to provide human identification and affiliation services. In IdentiGEN, the standardization and validation of the QIAquick PCR Purification Kit -QIAGEN method was performed for use in mineralized tissues. Extraction, quantification, DNA amplification and capillary electrophoresis tests were performed to ensure the efficacy of the method. The dental parts and bone fragments used were successfully typified, obtaining profiles of high quality and reliability, which support the efficiency and accuracy of the method for its intended use.

Keywords: DNA extraction, mineralized tissues, identification, validation of methods.

Introducción

El análisis de la molécula de ADN se ha convertido en una de las herramientas más precisas para la identificación de individuos y es utilizado por miles de laboratorios forenses fundamentalmente en: (1) La identificación de vestigios biológicos de interés en la investigación criminal de muy diversos delitos. (2) La identificación de restos humanos y personas desaparecidas. (3) La investigación biológica de la paternidad y otras relaciones de parentesco. Dependiendo del origen y calidad de la muestra, se implementan diferentes métodos especializados para la extracción y amplificación del ADN en pro de obtener perfiles de suficiente calidad para dar respuesta a estas solicitudes (Alonso Alonso, A. 2011.).

En los casos en que las fuentes biológicas más comunes de obtención de ADN (sangre, saliva, tejido muscular, etc.) no se encuentran disponibles o están demasiado degradadas, los tejidos mineralizados tales como huesos y dientes, han demostrado ser una fuente viable para la extracción de ADN, pues gracias a su composición, pueden soportar condiciones ambientales extremas y permitir que su material genético sea caracterizado mediante técnicas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa. Varias ventajas han sido descritas en estos tejidos, por un lado, la molécula queda comprimida entre los cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) los cuales tienen una alta afinidad por el ADN y lo estabilizan; además, la cantidad de agua y de enzimas degradantes que contiene el hueso es relativamente poca, así como en el caso de los dientes, donde el esmalte (tejido más duro del cuerpo humano) actúa como una barrera física a factores externos tales como la luz ultravioleta y los microorganismos (Jiménez-Arce et al,1999).

No obstante, debido a los bajos niveles de ADN endógeno en las muestras y al daño ambiental y bacteriano post mortem de la molécula, así como la posible presencia de inhibidores ambientales que se extraen conjuntamente con el ADN, la recuperación de material genético de muestras degradadas todavía puede suponer un desafío significativo, es por esto que el desarrollo y optimización de métodos eficaces de extracción y amplificación de material genético para estas matrices se ha convertido en una valiosa herramienta para la investigación forense (Loreille et al, T. 2007). Especialmente en contextos como el de Colombia, un país que carga con una historia de

violencia de más de medio siglo, con una cifra de desaparecidos que asciende las 99.000 personas según la UBPD (2022) y con un proceso de identificación que se ha dilatado tanto en el tiempo, ya sea por falta de recursos, personal profesionales o simple desinterés de las entidades gubernamentales, que al día de hoy luchan por concluir los más de 30.000 casos de cadáveres sin identificar (*Life: Datos de vida*, s. f.). Por esta razón, presentamos nuevas metodologías más eficientes para el análisis de muestras post mortem, que permiten dar una respuesta más ágil y oportuna al clamor de cientos de familias que aún esperan encontrar a sus seres queridos.

Actualmente, existen varios métodos para la obtención del ADN a partir de este tipo de tejidos: como los solventes orgánicos (fenol-cloroformo), las columnas de sílice y las perlas magnéticas recubiertas de polímero. Cada uno de ellos involucra un procedimiento distinto para la digestión y descalcificación del tejido óseo, así como la aplicación de diferentes principios fisicoquímicos para la purificación y la elución del ADN y el uso de diferentes cantidades iniciales de material pulverizado (Sierra, et al. 2018). Este trabajo abordará el método de columnas de sílice y será realizado en el Laboratorio de Identificación Genética - IdentiGEN- de la Universidad de Antioquia que presta los servicios especializados de identificación y filiación en humanos: paternidad, maternidad y otras relaciones de parentesco, y quien en pro de prestar el servicio a la comunidad, especialmente jurídica, necesita acreditar los ensayos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados a través de los métodos Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) y Powerplex Fusion® (Promega), ante el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC), para lo cual es indispensable validar dichos métodos y así confirmar que los procedimientos analíticos utilizados son adecuados para el uso previsto (IdentiGEN,P-SE-14;2019).

A través de la validación, el laboratorio pretende dar cumplimiento a la normativa NTC ISO/IEC 17025:2017, que exige la validación los métodos no normalizados y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. Para así continuar fungiendo según lo estipulado por la LEY 721 DE 2001, donde se establece la obligatoriedad de que los laboratorios de genética forense sean acreditados por la entidad competente para poder desempeñar sus labores jurídico-sociales.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Estandarizar y validar los métodos de extracción y amplificación de ADN en el Laboratorio IdentiGEN, para el procesamiento de tejidos mineralizados: huesos y dientes, con el fin de acreditar los ensayos ante ONAC, para la prestación de servicios de filiación e identificación humana.

1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el método actual de extracción (Qiaquick) de ADN a través de la comparación de diferentes condiciones de temperatura, tiempo y concentración de reactivos.
- Corroborar la eficacia del método de amplificación Powerplex Fusion® (Promega) a través de pruebas comparativas entre los perfiles obtenidos durante la estandarización.
- ‘Confirmar, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, que los métodos cumplen con los requisitos particulares para su uso específico previsto’ según la norma NTC ISO/IEC 17025:2017.

2. Marco teórico

Para Colombia, país que ha padecido un conflicto armado, social y político de más de 60 años y que lucha diariamente por anteponerse a la iniquidad de un estado, que ha actuado como guardián y verdugo en la guerra interna, las ciencias forenses, reclaman un papel de vital importancia en el esclarecimiento de la verdad y el fortalecimiento de la justicia transicional dentro del marco del proceso de paz, generando propuestas que promuevan el reconocimiento y la reparación de los derechos humanos de las víctimas de la violencia. Sin embargo, años de crimen organizado, enriquecimiento ilícito, corrupción, impunidad política y entorpecimiento de la justicia, han dejado un rastro innegable de atropellos a la dignidad humana (genocidios, usurpación de tierras, desplazamientos forzosos y desapariciones, entre otros) que al día de hoy presentan, junto con la inoperancia de los organismos constitucionales y la falta de recursos humanos y materiales, un obstáculo para la práctica eficaz de la labor forense (Narváez Caldas & Ordoñez Ortiz, 2021).

Basta con mirar las estadísticas de cuerpos sin identificar (producto directo o indirecto del conflicto) para darse cuenta de lo subdesarrollado y entorpecido que se encuentra el proceso de identificación en el país. En Colombia, de hecho, hay alrededor de 26.660- 35476 cuerpos no identificados (*Life: Datos de vida*, s. f.) que permanecen en las instituciones del Estado y en los cementerios del país (sin contar aquellos que se encuentran en fosas comunes) y que, a pesar del esfuerzo conjunto de organismos como la Unidad de Búsqueda de Personas dadas por Desaparecidas, Medicina Legal y La Fiscalía General de la Nación, aún no han sido entregados a sus familiares (UBPD, 2020). Por esta razón, es necesario reconocer la masiva tarea que tienen los especialistas forenses al recolectar, contrastar y analizar la información relevante para poder dar respuesta a los familiares de las víctimas. La identificación de restos humanos es un proceso comparativo y reconstructivo que involucra varias disciplinas forenses, más aún cuando se trata de escenarios de alto nivel de complejidad como es el caso de restos óseos fragmentados, mezclados y con un alto nivel de degradación. El abordaje forense actual de esos escenarios complejos supone la integración de la información proveniente de la antropología, la patología

y la odontología entre otras ciencias forenses, en conjunto con la genética y la estadística para la generación de resultados concluyentes (Sanabria Medina, s. f.).

Si bien aún se recurre a la identificación positiva de restos humanos a través del análisis y comparación de huellas dactilares, radiografías esqueléticas o dentales, y en ciertas ocasiones por la presencia de marcas únicas, tales como tatuajes o cicatrices, en los últimos años la tecnología de análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) ha surgido como una poderosa herramienta para la identificación individual, especialmente en casos donde el tejido blando está severamente descompuesto o dañado, o no se pueden hacer comparaciones odontológicas o antropológicas (Jiménez-Arce & Morera-Brenes, 1999). Como lo menciona Barrio-Caballero (2013), existen numerosos estudios que señalan que el material genético se degrada más rápidamente en tejidos blandos que en huesos, debido a la estructura más resistente del hueso que actúa como barrera física frente a las influencias tafonómicas. La densidad del hueso también es un factor importante que influye en su preservación. De este modo, el ADN está normalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como el fémur y la tibia. Así mismo, al utilizar dientes molares y premolares es posible obtener ADN de alto peso molecular, pues gracias a la estructura inerte mineralizada de las piezas dentales, estas preservan las células al interior de la cavidad pulpar por largos periodos de tiempo, incluso cuando el cuerpo está en un estado avanzado de descomposición, ya que el esmalte dental los hace resistentes a las circunstancias adversas que podrían degradar el ADN, como la humedad, la alta temperatura o la acción de hongos y bacterias (Raimann et al., 2012).

Sin embargo, aun con los métodos de extracción actuales, existen problemas metodológicos en la obtención de material genético a partir de tejidos mineralizados (huesos y dientes), como lo son: la escasez y fragmentación de las cadenas de ADN, las modificaciones moleculares consecuencia de la degradación post-mortem y la presencia de inhibidores de la PCR en los extractos (Barrio-Caballero, 2013), es por esto que el desarrollo y optimización de métodos eficaces de extracción y amplificación de material genético para estas matrices se ha convertido en uno de los principales propósitos de los laboratorios interesados en prestar los servicios de análisis genéticos en procesos con importancia jurídica. teniendo en cuenta que para poder poner

a disposición de la comunidad estas nuevas metodologías es necesario contar con el Certificado de Acreditación del ONAC y cumplir con los lineamientos estipulados por la normativa NTC ISO/IEC 17025 del 2017, para asegurar que dichos métodos proveen resultados confiables y exactos. En el caso particular del laboratorio IdentiGEN de la Universidad de Antioquia, se válido el método de extracción y amplificación de ADN a través de columnas de sílice (QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN), pues en concordancia con Rohland & Hofreiter (2007) se considera que este constituye un método rápido y fácil, que produce extractos de ADN antiguo dentro de tres (3) días hábiles e implica una carga de trabajo limitada, que es escalable, pues se adapta fácilmente a diferentes cantidades de polvo de hueso o dientes y volúmenes de extracción; además es fácil de implementar ya que requiere equipos de laboratorio estándar y un pequeño número de productos químicos procesables a temperatura ambiente consiguiendo la eliminación eficiente de los inhibidores de la PCR, por lo que puede ser de utilidad para complementar los servicios ofrecidos por el laboratorio en la resolución de casos de identificación o de filiación dónde no hay acceso a otros tejidos o fluidos biológicos, sino sólo a tejidos mineralizados.

3. Metodología

La metodología del proyecto tuvo dos momentos importantes: La estandarización y la validación, durante la estandarización se analizó que variables podían intervenir en el proceso de extracción y se determinó en qué condiciones de tiempo y temperatura de digestión se obtenían mejores resultados en cuanto a cantidad de ADN extraído. Inicialmente se realizó con hueso y posteriormente se extrapolaron los resultados a piezas dentales, asegurándose de que se obtenía material genético en buena cantidad y calidad de ambos tipos de muestras.

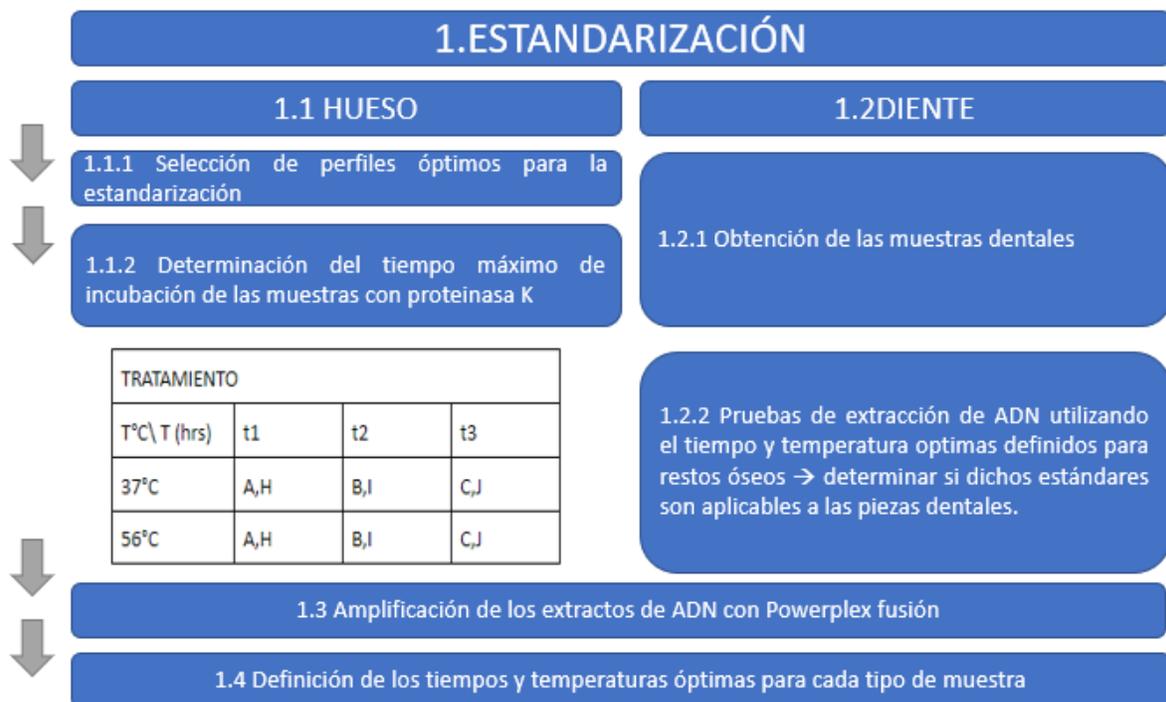


Ilustración 1. Esquema de estandarización para la extracción de ADN en tejidos mineralizados

Paso a paso del proceso de estandarización, cuyo objetivo era determinar la temperatura y el tiempo de digestión óptimo para el procesamiento de las muestras.

1. Selección de perfiles óptimos para la estandarización: Para huesos se hizo una revisión exhaustiva de las muestras óseas con las que contaba el laboratorio (las cuales reposan bajo cadena de custodia) y se revisaron los perfiles genéticos de cada

una, para determinar cuáles muestras eran las más adecuadas para el proceso de estandarización. Este paso permitió tener un control de la calidad de los perfiles obtenidos con los métodos actuales respecto a los anteriores.

Se consideró como perfil óptimo aquel que presentó la menor cantidad de ‘artefactos’, es decir, aquel que no presentó alelos:

- “stutter” (picos más pequeños que los alélicos, pero lo suficientemente grandes para ser visibles, que son resultado del deslizamiento de la cadena durante la síntesis de ADN).

- “pull up” (Se forman por un solapamiento en el espectro de emisión de los fluorocromos y presentan una altura menor que un alelo real y coinciden con los pares de bases de éste).

- “drop in” (producto de una amplificación inespecífica).

- “off Ladder” (alelos que caen por fuera de los beans del marcador de peso)

- “dye blob” (picos cortos y anchos.)

y donde, además, los alelos verdaderos superen los umbrales analíticos y de heterocigosis, 50 URF y 60% de desbalance, respectivamente (Lourdes Prieto, s. f.).

2. Se determinó el tiempo máximo de incubación de las muestras con proteinasa K a diferente temperatura, para la obtención de perfiles confiables. Una vez seleccionadas las muestras con las que se iba trabajar, se planteó un diseño experimental para medir la variación en la exactitud de los resultados al modificar el tiempo y la temperatura de incubación en muestras óseas con proteinasa K.

- A 56°C (T óptima) → Se determinó el tiempo óptimo de extracción dentro del rango actual [6 h - 16 h]

- A 37°C → Se determinó el tiempo óptimo al cual se obtiene material de suficiente calidad para el proceso de extracción y el tiempo al cual se obtienen resultados similares a los obtenidos bajo el tiempo y la temperatura óptima [rango de tiempo para digestión adecuada a esta temperatura].

El protocolo propuesto siguió los mismos pasos y uso las mismas cantidades que las establecidas en el protocolo de extracción del momento (I-SE-09; p 7. 2017) por IdentiGEN, modificando únicamente los tiempos y las temperaturas de incubación con proteinasa K de las muestras.

3. Obtención de las muestras dentales para la estandarización: se recurrió a consultorios odontológicos donde realizarán extracciones de molares para obtener el material necesario para la estandarización y validación del método. Adicionalmente, se tomo una muestra de sangre por cada paciente que done sus piezas dentales (siguiendo las medidas de bioseguridad y bajo consentimiento informado) para tener información suficiente con la cual cotejar los resultados de la extracción con Qiaquick y a cambio de participar en el estudio, se les entregó, por correo, el perfil genético a cada participante.
4. Para la estandarización del proceso de extracción de ADN a partir muestras dentales, se utilizó el tiempo y la temperatura de digestión óptimos establecidos previamente para los restos óseos, el único cambio fue la cantidad de EDTA utilizado (15mL en lugar de 30mL), ya que la cantidad de material recuperado al moler la pieza dental completa era mucho menor que en el caso de los huesos.
5. Ambos tipos de muestras (huesos y dientes), tanto para ensayos de estandarización como validación, se amplificaron con el método Powerplex fusion, un múltiplex de 24 locus para aplicaciones de identificación humana que incluyen análisis forense, pruebas de relaciones y uso de investigación, el cual provee alta sensibilidad y tolerancia a los inhibidores para trabajos de casos en humanos (I-SE-12; p. 5,2018). El método se aplicó tal cual está estipulado en el protocolo actual del kit Powerplex Fusion y las muestras se leyeron en Analizador genético ABI 3130, para la posterior revisión e interpretación de los resultados.

6. Una vez establecidos los tiempos y temperaturas óptimas para cada tipo de muestra se procedió a validar los métodos siguiendo el manual de procedimientos de validación y verificación de métodos analíticos (P-SE-14) establecido por el laboratorio, donde se definió el plan de validación, el desarrollo de pruebas, la evaluación de los resultados y finalmente se realizó el informe de validación que fue presentado ante el ONAC.

Como se muestra en la tabla 1, para la validación se tuvieron en cuenta los parámetros: especificidad, límite de detección y cuantificación, exactitud y precisión. La especificidad, que hace referencia a la capacidad de los primers de amplificación y demás reactivos de dar respuesta solo cuando se ponen a reaccionar con muestras de ADN humano, se midió realizando 2 réplicas de muestras de bovino o equinos, los límites de detección y cuantificación se determinaron mediante la ejecución de pruebas repetidas de una solución "blanco", se calculó el promedio de los resultados de la prueba, así como su desviación estándar y a continuación se agregó tres veces el valor de desviación estándar de la media, para obtener el límite de detección para dicho método. Mientras que el límite de cuantificación se calculó como el promedio de replicados de las pruebas en blanco, más 10 veces la desviación estándar. La exactitud del método se observó con la aplicación de controles positivos con patrones alélicos previamente conocidos, establecidos en nuestro caso por los controles de calidad Interlaboratorios y de la casa comercial. Por último, la precisión sea expresó matemáticamente como el promedio de los datos, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Si el CV es menor o igual al 10% se acepta que el método de análisis es preciso, de lo contrario se cuestiona su precisión y se procede a intervenir el método para saber en dónde se falla.

La prueba de robustez se subsano con la estandarización, pues en esta se tuvo en cuenta todas las posibles variables: cantidad de reactivos, marcas de reactivos, temperaturas, equipos, tiempos de reacción, tipos de matrices biológicas, entre otros.

Tabla 1. Criterios de aceptación para la validación.

Parámetros de validación a evaluar	Número de análisis	Criterios de aceptación
Especificidad	2 réplicas de muestras de bovino o equinos (sólo evalúa especificidad en la PCR - muestras extraídas por chelex 100)	Garantizar que el kit sólo amplifica muestras de origen humano.
Límite de detección - Límite de Cuantificación	10 réplicas de blancos (desde Extracción de ADN)	Se acepta un requisito mínimo de relación señal/ruido de 3:1, para el LD y 10:1 para LC. El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección.
Exactitud	10 réplicas de una muestra de control Interlaboratorio (desde PCR) 10 réplicas de control positivo 2800M (desde PCR)	Se aceptan valores con una variación mínima de 0.01pb hasta 0.5pb, que es el valor máximo permitido para la asignación alélica.
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)	Repetibilidad: 5 réplicas de la misma muestra, mismo analista, mismo día (muestra problema - desde extracción) Reproducibilidad: 5 réplicas de la misma muestra, diferente analista, diferente día (muestra problema - desde extracción)	Si el CV es menor o igual al 10% se acepta que el método es preciso.

4. Resultados

En éste apartado se muestran los resultados no sólo de las extracciones realizadas con el método de columna de sílice (QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN), sino que también se presentan los resultados obtenidos a través del método a base de perlas magnéticas (ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit - Invitrogen), que si bien, no entraba en el marco de esta primera validación, durante el desarrollo de las prácticas descubrimos que era una alternativa viable cuando se trabaja con piezas dentales, tanto permanentes como temporales. La metodología de extracción de ADN a través de perlas magnéticas cuenta con su propio protocolo dentro del laboratorio y su adaptación a piezas dentales fue presentada en el XVI Congreso colombiano y X Congreso Internacional de genética humana, con miras a ampliar la investigación de sus posibles usos en el ámbito forense.

4.1 Estandarización de la extracción de ADN en tejido mineralizado (huesos y dientes)

Los ensayos de estandarización se realizaron primero con hueso, se utilizaron 2 muestras presentes en el laboratorio y que ya habían cumplido la cadena de custodia, estas se eligieron por presentar perfiles limpios (sin alelos stutter, dye blob, drop out u otros artefactos de amplificación). Las muestras se pulverizaron y el polvo obtenido se dividió en los diferentes ensayos de tiempo para las 2 temperaturas durante el paso de digestión en el buffer de lisis; La tabla 2 muestra las temperaturas usadas y el tiempo de digestión con el que se trató la muestra, así mismo la cantidad de polvo de hueso utilizado y la concentración de ADN obtenido tras la cuantificación. La elección del tiempo y temperatura a utilizar para los ensayos de validación tomó a consideración no sólo la cantidad de ADN extraído (pues en todos los ensayos se obtuvo material suficiente pero una buena tipificación) sino que el procesamiento completo del resto óseo, desde su limpieza hasta la extracción y purificación del material genético, puede demorarse hasta 3 días y conlleva pasos que pueden tardar de un día para otro, como es el caso de la limpieza con SDS y la lisis con proteinasa K. Por estas razones, se decidió que la digestión de las muestras para los ensayos de validación se realizaría a 56 °C por 18 horas O en caso de ser necesario a 37 °C por 20 horas.

Tabla 2. Estandarización del proceso de extracción de ADN en fragmentos de hueso. [ADN] medida por fluorometría en ug/mL.

Muestra	y	56°C						37°C					
		MA.1:	MB.1:	MA.2:	MB.2:	MA.3:	MB.3:	MA.4:	MB.4:	MA.5:	MB.5:	MA.6:	MB.6:
Muestra		56°C/6	56°C/6	56°C/10	56°C/10	56°C/18	56°C/18	37°C/16	37°C/16	37°C/20	37°C/20	37°C/24	37°C/24
B	Tratamiento	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	Cantidad de muestra (gr)	1,02	1	1,1	1	1,06	1	1,03	1	1,04	1	1,14	1
HUESOS	[ADN] tras la cuantificación (ug/ml)	0,17	0,17	0,78	0,47	0,68	0,21	0,98	0,21	0,75	0,2	0,59	0,3

Para el caso de los dientes, se determinó trabajar con los mismos tiempos y temperaturas óptimas de digestión definidas para hueso, modificando únicamente el volumen de buffer de lisis utilizado; pues la cantidad de muestra que se obtiene al pulverizar la pieza dental completa es mucho menor (menos de 1g) de la que se obtiene para un fragmento de hueso. Realizando exactamente el mismo procedimiento con el pequeño cambio en el volumen del buffer fue posible extraer para él es suficiente para una buena tipificación.

4.2. Ensayos de validación para restos óseos

Una vez definidos el tiempo y la temperatura apropiada para la digestión, se realizaron los ensayos para la validación, en este caso se utilizaron 2 fragmentos de hueso diferentes, para las pruebas de precisión, una muestra control Inter laboratorio (M4 SLAGF 2017) y el control positivo 2800M para la prueba de exactitud, prueba de especificidad se realizó con una muestra de bovino.

Tabla 3. Blanco de reactivos, medido en URF con diez réplicas.

MARCADOR	REPLICAS - BLANCO DE REACTIVOS										MEDIA	DS	LD	LC	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
AMEL	4	2	5	5	3	1	3	4	4	2	3,3	1,3	7,3	16,7	
D3S1358	2	3	3	4	4	2	3	4	4	5	3,4	1,0	6,3	13,1	
D1S1656	4	2	6	6	1	4	5	4	4	3	3,9	1,6	8,7	19,9	
D2S441	3	3	3	4	2	1	3	2	2	4	2,7	0,9	5,5	12,2	
D10S1248	5	4	4	2	4	4	2	2	6	2	3,5	1,4	7,8	17,8	
D13S317	3	3	3	6	5	6	5	5	3	2	4,1	1,4	8,4	18,6	
Penta E	4	5	3	4	4	3	3	3	5	4	3,8	0,8	6,2	11,7	
D16S539	7	5	9	4	5	7	8	5	4	3	5,7	1,9	11,5	25,2	
D18S51	9	8	9	1	16	3	7	6	4	4	6,7	4,2	19,4	48,9	
D2S1338	6	5	8	6	5	8	7	7	3	7	6,2	1,5	10,8	21,7	
CSF1PO	6	5	3	3	5	7	7	5	4	4	4,9	1,4	9,2	19,4	
Penta D	4	3	4	5	2	3	3	4	6	5	3,9	1,2	7,5	15,9	
TH01	3	6	1	1	2	4	5	3	5	3	3,3	1,7	8,4	20,3	
vWA	6	4	4	3	3	4	6	3	5	7	4,5	1,4	8,8	18,8	
D21S11	5	6	6	4	4	5	8	4	2	4	4,8	1,6	9,7	21,0	
D7S820	2	2	2	4	4	3	4	6	3	4	3,4	1,3	7,2	16,0	
D5S818	6	5	3	4	3	3	3	4	5	4	4,0	1,1	7,2	14,5	
TPOX	5	6	2	4	2	3	4	2	6	4	3,8	1,5	8,4	19,3	
DYS391	4	4	4	3	4	3	4	2	8	5	4,1	1,6	8,9	20,1	
D8S1179	2	2	1	3	1	3	2	3	2	1	2,0	0,8	4,4	10,2	
D12S391	3	2	2	2	3	2	3	4	3	3	2,7	0,7	4,7	9,4	
D19S433	5	2	3	3	2	2	3	2	3	4	2,9	1,0	5,9	12,8	
FGA	5	2	3	3	1	2	3	3	2	3	2,7	1,1	5,9	13,3	
D22S1045	3	3	1	1	2	1	2	1	3	3	2,0	0,9	4,8	11,4	
											TOTA	3,8	1,4	8,0	17,8

Se calcularon los límites de detección y cuantificación para el método a través de la desviación estándar en las alturas de los picos de los alelos obtenidos durante el ensayo de blancos reactivos. tanto LD como LC están dentro del rango aceptado para la validación

Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales.

Tabla 4. Lectura de muestra de control interlaboratorio (fragmento de hueso), medido en pares de bases, con diez réplicas.

		REPLICAS - M4 SLAGF 2017											
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	DS
AMEL	X	79,05	79,23	79,09	79,09	79,10	79,23	79,16	79,16	79,10	79,24	79,15	0,07
	Y	85,27	85,42	85,31	85,36	85,31	85,49	85,37	85,42	85,35	85,46	85,38	0,07
D3S1358	16	124,99	124,75	124,98	125,02	124,98	124,84	124,93	125,00	125,01	124,81	124,93	0,10
	17	128,94	129,07	128,95	129,04	129,31	129,11	128,97	129,00	128,96	129,11	129,05	0,11
D1S1656	16	184,73	184,90	184,77	184,83	185,07	184,92	184,82	184,85	184,80	184,88	184,86	0,09
	17,3	191,86	191,98	191,81	191,91	191,87	192,00	191,88	191,93	191,83	191,94	191,90	0,06
D2S441	11	220,97	220,45	220,26	220,94	220,91	220,49	220,90	220,92	220,91	220,39	220,71	0,28
	16	241,61	241,16	241,60	241,10	241,60	241,16	241,55	241,06	241,59	241,16	241,36	0,25
D10S1248	14	273,86	274,07	273,92	274,00	273,88	274,08	273,93	274,01	273,90	274,07	273,97	0,08
	15	277,78	277,90	277,85	277,89	277,83	277,93	277,87	277,91	277,78	277,95	277,87	0,06
D13S317	10	317,57	317,23	317,08	317,15	317,09	317,33	317,12	317,14	317,61	317,24	317,26	0,19
	12	325,41	325,44	325,37	325,51	325,35	325,43	325,43	325,43	325,42	325,43	325,42	0,04
Penta E	5	365,44	365,61	365,41	365,64	365,43	365,63	365,48	365,63	365,41	365,62	365,53	0,10
	12	399,72	399,78	399,78	399,78	399,71	399,78	399,71	399,78	399,72	399,85	399,76	0,05
D16S539	9	95,20	95,14	95,24	95,19	95,24	95,20	95,26	95,28	95,28	95,15	95,22	0,05
	12	108,44	108,34	108,38	108,38	108,48	108,40	108,49	108,46	108,44	108,34	108,42	0,05
D18S51	13	153,70	153,80	153,61	153,70	153,72	153,81	153,65	153,75	153,66	153,80	153,72	0,07
	14	157,83	157,89	157,80	157,88	157,84	157,96	157,81	157,90	157,86	157,96	157,87	0,06
D2S1338	16	244,65	244,54	244,64	244,61	244,61	244,48	244,63	244,61	244,62	244,54	244,59	0,05
	17	248,65	248,56	248,62	248,63	248,60	248,44	248,64	248,65	248,62	248,49	248,59	0,07
CSF1PO	12	343,46	343,31	343,45	343,38	343,40	343,39	343,42	343,40	343,50	343,33	343,40	0,06
	12	343,46	343,31	343,45	343,38	343,40	343,39	343,42	343,40	343,50	343,33	343,40	0,06
Penta D	11	420,33	420,39	420,34	420,45	420,41	420,44	420,40	420,46	420,41	420,48	420,41	0,05
	12	425,51	425,54	425,47	425,62	425,53	425,61	425,54	425,61	425,52	425,54	425,55	0,05
TH01	7	82,53	82,60	82,55	82,54	82,59	82,60	82,61	82,60	82,64	82,59	82,59	0,03
	9	91,30	91,26	91,34	91,30	91,32	91,26	91,38	91,34	91,39	91,22	91,31	0,05
vWA	14	142,53	142,55	142,50	142,49	142,53	142,54	142,55	142,54	142,57	142,55	142,54	0,02
	17	154,78	154,78	154,74	154,77	154,84	154,80	154,78	154,81	154,83	154,78	154,79	0,03
D21S11	29	223,92	223,93	223,92	223,93	223,96	223,94	223,94	223,87	223,90	223,86	223,92	0,03
	31,2	234,11	234,14	234,16	234,15	234,13	234,09	234,12	234,12	234,15	234,07	234,12	0,03
D7S820	10	289,96	289,98	289,96	290,00	290,03	289,98	289,99	290,04	290,05	289,97	290,00	0,03
	11	293,99	294,07	294,02	294,02	294,09	294,02	294,05	294,05	294,04	294,04	294,04	0,03
D5S818	11	343,73	343,60	343,67	343,67	343,62	343,60	343,71	343,62	343,71	343,62	343,66	0,05
	11	343,73	343,60	343,67	343,67	343,62	343,60	343,71	343,62	343,71	343,62	343,66	0,05
TPOX	8	410,05	410,07	410,05	410,03	410,01	410,10	410,04	410,07	409,98	410,12	410,05	0,04
	11	422,18	422,22	422,18	422,21	422,20	422,25	422,22	422,19	422,17	422,23	422,21	0,03
DYS391	10	466,79	466,80	466,75	466,82	466,76	466,77	466,82	466,79	466,86	466,79	466,80	0,03
	10	466,79	466,80	466,75	466,82	466,76	466,77	466,82	466,79	466,86	466,79	466,80	0,03
D8S1179	12	93,49	93,52	93,54	93,49	93,56	93,58	93,57	93,59	93,54	93,53	93,54	0,03
	14	102,23	102,23	102,24	102,24	102,28	102,30	102,30	102,30	102,27	102,23	102,26	0,03
D12S391	18	151,19	151,18	151,12	151,15	151,21	151,21	151,11	151,22	151,17	151,18	151,17	0,04
	20	159,39	159,37	159,29	159,36	159,44	159,37	159,30	159,37	159,38	159,37	159,36	0,04
D19S433	14	226,35	226,43	226,37	226,43	226,39	226,41	226,35	226,34	226,37	226,36	226,38	0,03
	15	230,40	230,43	230,40	230,43	230,43	230,43	230,41	230,37	230,36	230,43	230,41	0,03
FGA	25	309,57	309,63	309,63	309,62	309,64	309,63	309,64	309,60	309,64	309,60	309,62	0,02
	26	313,46	313,49	313,53	313,49	313,54	313,51	313,56	313,47	313,55	313,52	313,51	0,03
D22S1045	15	453,77	453,86	453,77	453,80	453,84	453,80	453,85	453,82	453,80	453,78	453,81	0,03
	16	456,79	456,84	456,79	456,80	456,82	456,81	456,82	456,78	456,82	456,84	456,81	0,02
												TOTAL DS	0,06

Tabla 5. Lectura de muestra de control positivo 2800M, medido en pares de bases con diez réplicas.

		REPLICAS - CONTROL POSITIVO - 2800M											
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	DS
AMEL	X	79,35	79,36	79,29	79,35	79,35	79,29	79,36	79,29	79,36	79,36	79,34	0,03
	Y	85,55	85,51	85,47	85,57	85,55	85,53	85,56	85,48	85,51	85,52	85,53	0,03
D3S1358	17	129,30	129,27	129,30	129,25	129,29	129,27	129,31	129,26	129,31	129,25	129,28	0,02
	18	133,50	133,50	133,50	133,47	133,49	133,50	133,48	133,45	133,48	133,50	133,49	0,02
D1S1656	12	168,90	168,92	168,89	168,89	168,93	168,87	168,87	168,83	168,83	168,86	168,88	0,03
	13	172,84	172,87	172,86	172,86	172,89	172,85	172,79	172,77	172,82	172,85	172,84	0,04
D2S441	10	216,58	216,61	216,60	216,55	216,63	216,58	216,63	216,58	216,61	216,59	216,60	0,03
	14	233,09	233,11	233,08	233,06	233,06	233,09	233,09	233,09	233,09	233,02	233,08	0,03
D10S1248	13	270,19	270,13	270,15	270,13	270,08	270,10	270,14	270,12	270,10	270,09	270,12	0,03
	15	278,13	278,09	278,09	278,10	278,09	278,04	278,12	278,06	278,03	278,00	278,08	0,04
D13S317	9	313,37	313,32	313,34	313,31	313,34	313,33	313,36	313,29	313,36	313,35	313,34	0,02
	11	321,46	321,39	321,38	321,42	321,38	321,37	321,35	321,39	321,36	321,35	321,39	0,03
Penta E	7	375,39	375,30	375,31	375,39	375,31	375,31	375,31	375,39	375,31	375,38	375,34	0,04
	14	409,40	409,26	409,34	409,31	409,30	409,34	409,35	409,36	409,40	409,32	409,34	0,04
D16S539	9	94,94	94,90	94,86	94,92	94,86	94,88	94,92	94,86	94,90	94,88	94,89	0,03
	13	112,47	112,45	112,44	112,49	112,44	112,46	112,42	112,47	112,42	112,42	112,45	0,02
D18S51	16	166,53	166,58	166,50	166,51	166,55	166,53	166,51	166,46	166,48	166,54	166,52	0,03
	18	174,70	174,78	174,73	174,74	174,76	174,76	174,72	174,63	174,74	174,75	174,73	0,04
D2S1338	22	269,00	268,96	269,03	268,93	268,97	268,92	268,96	268,93	268,93	268,94	268,96	0,04
	25	281,12	281,10	281,10	281,06	281,10	281,08	281,09	281,04	281,06	281,07	281,08	0,02
CSF1PO	12	342,95	342,90	342,88	342,91	342,90	342,85	342,89	342,92	342,93	343,01	342,91	0,04
	12	342,95	342,90	342,88	342,91	342,90	346,84	342,89	342,92	342,93		343,35	1,31
Penta D	12	425,57	425,48	425,49	425,50	425,49	425,57	425,48	425,49	425,48	425,40	425,50	0,05
	13	430,93	430,86	430,81	430,80	430,82	430,83	430,80	430,77	430,77	430,74	430,81	0,05
TH01	6	78,35	78,29	78,29	78,34	78,28	78,29	78,30	78,29	78,30	78,30	78,30	0,02
	9,3	94,51	94,47	94,42	94,48	94,43	94,52	94,49	94,50	94,47	94,46	94,48	0,03
vWA	16	150,67	150,70	150,62	150,63	150,67	150,66	150,66	150,59	150,66	150,62	150,65	0,03
	19	161,94	161,98	161,95	162,03	162,02	161,92	162,00	161,94	162,00	161,97	161,98	0,04
D21S11	29	223,90	223,92	223,97	223,89	223,90	223,91	223,98	223,90	223,91	223,93	223,92	0,03
	31,2	234,12	234,13	234,12	234,11	234,09	234,12	234,11	234,12	234,11	234,10	234,11	0,01
D7S820	8	281,92	281,89	281,91	281,87	281,83	281,88	281,88	281,84	281,86	281,85	281,87	0,03
	11	293,94	294,03	293,97	293,93	293,97	293,98	293,99	293,94	293,92	294,00	293,97	0,03
D5S818	12	347,27	347,23	347,24	347,23	347,25	347,21	347,28	347,26	347,22	347,25	347,24	0,02
	12	347,27	347,23	347,24	347,23	347,25	347,21	347,28	347,26	347,22	347,25	347,24	0,02
TPOX	11	422,22	422,18	422,27	422,17	422,20	422,23	422,23	422,21	422,25	422,13	422,21	0,04
	11	422,22	422,18	422,27	422,17	422,20	422,23	422,23	422,21	422,25	422,13	422,21	0,04
DYS391	10	466,79	466,76	466,66	466,69	466,71	466,76	466,66	466,69	466,68	466,74	466,70	0,04
	10	466,79	466,76	466,66	466,69	466,71	466,76	466,66	466,69	466,68	466,74	466,70	0,04
D8S1179	14	102,43	102,42	102,37	102,38	102,37	102,42	102,35	102,36	102,35	102,41	102,39	0,03
	15	106,79	106,81	106,74	106,76	106,74	106,82	106,76	106,79	106,76	106,79	106,78	0,03
D12S391	18	150,96	151,06	150,99	151,00	150,96	150,95	150,94	150,88	151,02	150,97	150,97	0,05
	23	171,84	171,89	171,85	171,85	171,88	171,85	171,79	171,77	171,82	171,87	171,84	0,04
D19S433	13	222,29	222,27	222,34	222,33	222,28	222,31	222,30	222,29	222,32	222,36	222,36	0,03
	14	226,32	226,30	226,33	226,34	226,33	226,31	226,31	226,32	226,38	226,36	226,36	0,02
FGA	20	290,22	290,23	290,29	290,23	290,22	290,21	290,29	290,22	290,24	290,21	290,24	0,03
	23	301,78	301,74	301,78	301,72	301,78	301,75	301,75	301,70	301,75	301,80	301,76	0,03
D22S1045	16	456,73	456,70	456,69	456,74	456,72	456,77	456,72	456,67	456,68	456,74	456,72	0,03
	16	456,73	456,70	456,69	456,74	456,72	456,77	456,72	456,67	456,68	456,74	456,72	0,03
TOTAL DS												0,06	

En las tablas 4 y 5 se obtuvo la desviación estándar del peso de los alelos de los diferentes marcadores analizados, en los controles entre el laboratorio y positivo respectivamente, para el cálculo de exactitud y los resultados muestran que la variación en los valores está en el rango aprobado para la validación.

Para las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad se calculó el coeficiente de variación (CV) con los pesos de los alelos de los marcadores analizados y como lo muestran las ilustraciones 2 y 3 se obtuvo un valor menor al 10% por lo que se determinó que el método era preciso.

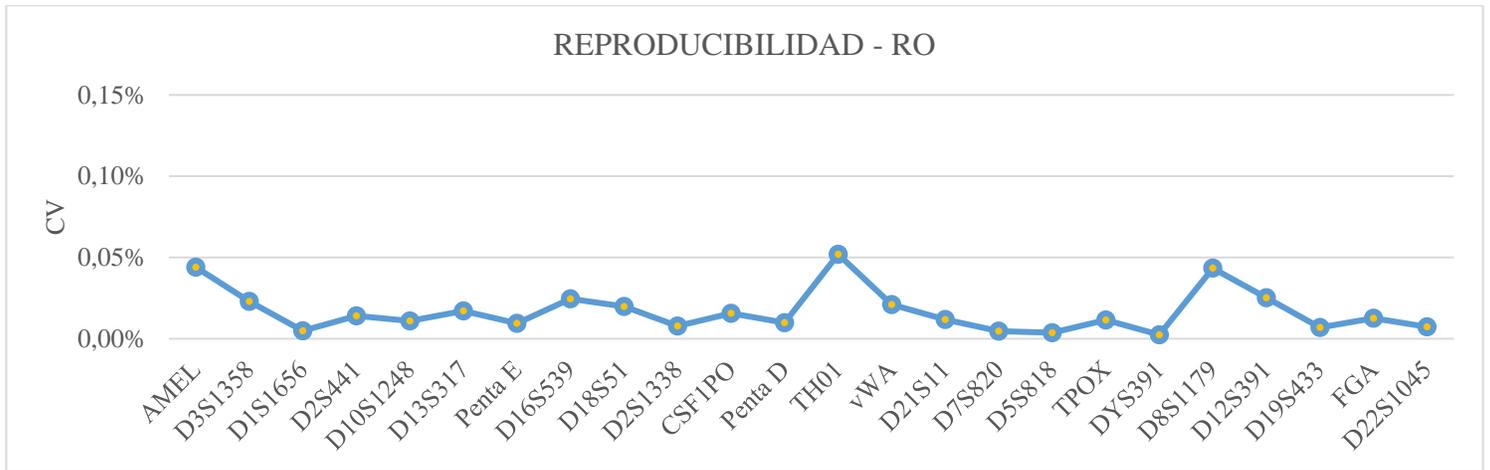


Ilustración 2. Gráfico de dispersión del CV por marcador para la prueba de reproducibilidad.

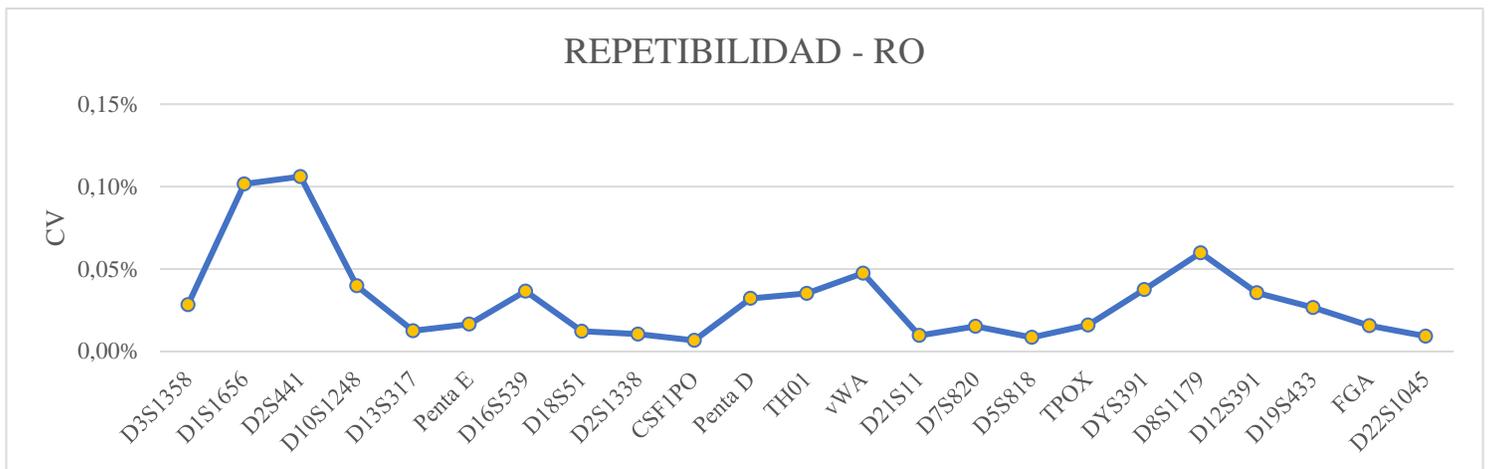


Ilustración 3. Gráfico de dispersión del CV por marcador, para la prueba de repetibilidad

El CV representa la dispersión relativa del conjunto de datos (en este caso del tamaño alélico medido en pares de bases) y al obtener valores por debajo o iguales al 10% (límite aceptado para

la validación) se considera que la variación en los datos es despreciable y por tanto el método es preciso.

4.3 Ensayos de validación en piezas dentales:

Al igual que para hueso, las tablas muestran los resultados de las pruebas de especificidad, exactitud, precisión y límite de detección y cuantificación a las cuales fueron sometidos los métodos de extracción y amplificación de ADN para su uso en piezas dentales. La prueba de especificidad se realizó con una muestra de bovino, la de exactitud con la muestra interlaboratorio M4 SLAGF 2017 y el control positivo 2800M, los LC y LD se determinaron a través de las réplicas de blanco de reactivos y para las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad se utilizaron 2 muestras diferentes en tiempos diferentes.

Tabla 6. Blanco de reactivos, medido en URF con diez réplicas.

MARCADOR	REPLICAS - BLANCO DE REACTIVOS										MEDIA	DS	LD	LC	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
AMEL	4	2	5	5	3	1	3	4	4	2	3,3	1,3	7,3	16,7	
D3S1358	2	3	3	4	4	2	3	4	4	5	3,4	1,0	6,3	13,1	
D1S1656	4	2	6	6	1	4	5	4	4	3	3,9	1,6	8,7	19,9	
D2S441	3	3	3	4	2	1	3	2	2	4	2,7	0,9	5,5	12,2	
D10S1248	5	4	4	2	4	4	2	2	6	2	3,5	1,4	7,8	17,8	
D13S317	3	3	3	6	5	6	5	5	3	2	4,1	1,4	8,4	18,6	
Penta E	4	5	3	4	4	3	3	3	5	4	3,8	0,8	6,2	11,7	
D16S539	7	5	9	4	5	7	8	5	4	3	5,7	1,9	11,5	25,2	
D18S51	9	8	9	1	16	3	7	6	4	4	6,7	4,2	19,4	48,9	
D2S1338	6	5	8	6	5	8	7	7	3	7	6,2	1,5	10,8	21,7	
CSF1PO	6	5	3	3	5	7	7	5	4	4	4,9	1,4	9,2	19,4	
Penta D	4	3	4	5	2	3	3	4	6	5	3,9	1,2	7,5	15,9	
TH01	3	6	1	1	2	4	5	3	5	3	3,3	1,7	8,4	20,3	
vWA	6	4	4	3	3	4	6	3	5	7	4,5	1,4	8,8	18,8	
D21S11	5	6	6	4	4	5	8	4	2	4	4,8	1,6	9,7	21,0	
D7S820	2	2	2	4	4	3	4	6	3	4	3,4	1,3	7,2	16,0	
D5S818	6	5	3	4	3	3	3	4	5	4	4,0	1,1	7,2	14,5	
TPOX	5	6	2	4	2	3	4	2	6	4	3,8	1,5	8,4	19,3	
DYS391	4	4	4	3	4	3	4	2	8	5	4,1	1,6	8,9	20,1	
D8S1179	2	2	1	3	1	3	2	3	2	1	2,0	0,8	4,4	10,2	
D12S391	3	2	2	2	3	2	3	4	3	3	2,7	0,7	4,7	9,4	
D19S433	5	2	3	3	2	2	3	2	3	4	2,9	1,0	5,9	12,8	
FGA	5	2	3	3	1	2	3	3	2	3	2,7	1,1	5,9	13,3	
D22S1045	3	3	1	1	2	1	2	1	3	3	2,0	0,9	4,8	11,4	
											TOTA	3,8	1,4	8,0	17,8

Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales.

Tabla 7. Lectura de muestra de control Interlaboratorio (fragmento de hueso), medido en pares de bases con diez réplicas.

		REPLICAS - M4 SLAGF 2017											
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	DS
AMEL	X	79,05	79,23	79,09	79,09	79,10	79,23	79,16	79,16	79,10	79,24	79,15	0,07
	Y	85,27	85,42	85,31	85,36	85,31	85,49	85,37	85,42	85,35	85,46	85,38	0,07
D3S1358	16	124,99	124,75	124,98	125,02	124,98	124,84	124,93	125,00	125,01	124,81	124,93	0,10
	17	128,94	129,07	128,95	129,04	129,31	129,11	128,97	129,00	128,96	129,11	129,05	0,11
D1S1656	16	184,73	184,90	184,77	184,83	185,07	184,92	184,82	184,85	184,80	184,88	184,86	0,09
	17,3	191,86	191,98	191,81	191,91	191,87	192,00	191,88	191,93	191,83	191,94	191,90	0,06
D2S441	11	220,97	220,45	220,26	220,94	220,91	220,49	220,90	220,92	220,91	220,39	220,71	0,28
	16	241,61	241,16	241,60	241,10	241,60	241,16	241,55	241,06	241,59	241,16	241,36	0,25
D10S1248	14	273,86	274,07	273,92	274,00	273,88	274,08	273,93	274,01	273,90	274,07	273,97	0,08
	15	277,78	277,90	277,85	277,89	277,83	277,93	277,87	277,91	277,78	277,95	277,87	0,06
D13S317	10	317,57	317,23	317,08	317,15	317,09	317,33	317,12	317,14	317,61	317,24	317,26	0,19
	12	325,41	325,44	325,37	325,51	325,35	325,43	325,43	325,43	325,42	325,43	325,42	0,04
Penta E	5	365,44	365,61	365,41	365,64	365,43	365,63	365,48	365,63	365,41	365,62	365,53	0,10
	12	399,72	399,78	399,78	399,78	399,71	399,78	399,71	399,78	399,72	399,85	399,76	0,05
D16S539	9	95,20	95,14	95,24	95,19	95,24	95,20	95,26	95,28	95,28	95,15	95,22	0,05
	12	108,44	108,34	108,38	108,38	108,48	108,40	108,49	108,46	108,44	108,34	108,42	0,05
D18S51	13	153,70	153,80	153,61	153,70	153,72	153,81	153,65	153,75	153,66	153,80	153,72	0,07
	14	157,83	157,89	157,80	157,88	157,84	157,96	157,81	157,90	157,86	157,96	157,87	0,06
D2S1338	16	244,65	244,54	244,64	244,61	244,61	244,48	244,63	244,61	244,62	244,54	244,59	0,05
	17	248,65	248,56	248,62	248,63	248,60	248,44	248,64	248,65	248,62	248,49	248,59	0,07
CSF1PO	12	343,46	343,31	343,45	343,38	343,40	343,39	343,42	343,40	343,50	343,33	343,40	0,06
	12	343,46	343,31	343,45	343,38	343,40	343,39	343,42	343,40	343,50	343,33	343,40	0,06
Penta D	11	420,33	420,39	420,34	420,45	420,41	420,44	420,40	420,46	420,41	420,48	420,41	0,05
	12	425,51	425,54	425,47	425,62	425,53	425,61	425,54	425,61	425,52	425,54	425,55	0,05
TH01	7	82,53	82,60	82,55	82,54	82,59	82,60	82,61	82,60	82,64	82,59	82,59	0,03
	9	91,30	91,26	91,34	91,30	91,32	91,26	91,38	91,34	91,39	91,22	91,31	0,05
vWA	14	142,53	142,55	142,50	142,49	142,53	142,54	142,55	142,54	142,57	142,55	142,54	0,02
	17	154,78	154,78	154,74	154,77	154,84	154,80	154,78	154,81	154,83	154,78	154,79	0,03
D21S11	29	223,92	223,93	223,92	223,93	223,96	223,94	223,94	223,87	223,90	223,86	223,92	0,03
	31,2	234,11	234,14	234,16	234,15	234,13	234,09	234,12	234,12	234,15	234,07	234,12	0,03
D7S820	10	289,96	289,98	289,96	290,00	290,03	289,98	289,99	290,04	290,05	289,97	290,00	0,03
	11	293,99	294,07	294,02	294,02	294,09	294,02	294,05	294,05	294,04	294,04	294,04	0,03
D5S818	11	343,73	343,60	343,67	343,67	343,62	343,60	343,71	343,62	343,71	343,62	343,66	0,05
	11	343,73	343,60	343,67	343,67	343,62	343,60	343,71	343,62	343,71	343,62	343,66	0,05
TPOX	8	410,05	410,07	410,05	410,03	410,01	410,10	410,04	410,07	409,98	410,12	410,05	0,04
	11	422,18	422,22	422,18	422,21	422,20	422,25	422,22	422,19	422,17	422,23	422,21	0,03
DYS391	10	466,79	466,80	466,75	466,82	466,76	466,77	466,82	466,79	466,86	466,79	466,80	0,03
	10	466,79	466,80	466,75	466,82	466,76	466,77	466,82	466,79	466,86	466,79	466,80	0,03
D8S1179	12	93,49	93,52	93,54	93,49	93,56	93,58	93,57	93,59	93,54	93,53	93,54	0,03
	14	102,23	102,23	102,24	102,24	102,28	102,30	102,30	102,30	102,27	102,23	102,26	0,03
D12S391	18	151,19	151,18	151,12	151,15	151,21	151,21	151,11	151,22	151,17	151,18	151,17	0,04
	20	159,39	159,37	159,29	159,36	159,44	159,37	159,30	159,37	159,38	159,37	159,36	0,04
D19S433	14	226,35	226,43	226,37	226,43	226,39	226,41	226,35	226,34	226,37	226,36	226,38	0,03
	15	230,40	230,43	230,40	230,43	230,43	230,43	230,41	230,37	230,36	230,43	230,41	0,03
FGA	25	309,57	309,63	309,63	309,62	309,64	309,63	309,64	309,60	309,64	309,60	309,62	0,02
	26	313,46	313,49	313,53	313,49	313,54	313,51	313,56	313,47	313,55	313,52	313,51	0,03
D22S1045	15	453,77	453,86	453,77	453,80	453,84	453,80	453,85	453,82	453,80	453,78	453,81	0,03
	16	456,79	456,84	456,79	456,80	456,82	456,81	456,82	456,78	456,82	456,84	456,81	0,02
												TOTAL DS	0,06

Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales.

Tabla 8. Lectura de muestra de control positivo 2800M, medido en pares de bases con diez réplicas.

		REPLICAS - CONTROL POSITIVO - 2800M											
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	DS
AMEL	X	79,35	79,36	79,29	79,35	79,35	79,29	79,36	79,29	79,36	79,36	79,34	0,03
	Y	85,55	85,51	85,47	85,57	85,55	85,53	85,56	85,48	85,51	85,52	85,53	0,03
D3S1358	17	129,30	129,27	129,30	129,25	129,29	129,27	129,31	129,26	129,31	129,25	129,28	0,02
	18	133,50	133,50	133,50	133,47	133,49	133,50	133,48	133,45	133,48	133,50	133,49	0,02
D1S1656	12	168,90	168,92	168,89	168,89	168,93	168,87	168,87	168,83	168,83	168,86	168,88	0,03
	13	172,84	172,87	172,86	172,86	172,89	172,85	172,79	172,77	172,82	172,85	172,84	0,04
D2S441	10	216,58	216,61	216,60	216,55	216,63	216,58	216,63	216,58	216,61	216,59	216,60	0,03
	14	233,09	233,11	233,08	233,06	233,06	233,09	233,09	233,09	233,09	233,02	233,08	0,03
D10S1248	13	270,19	270,13	270,15	270,13	270,08	270,10	270,14	270,12	270,10	270,09	270,12	0,03
	15	278,13	278,09	278,09	278,10	278,09	278,04	278,12	278,06	278,03	278,00	278,08	0,04
D13S317	9	313,37	313,32	313,34	313,31	313,34	313,33	313,36	313,29	313,36	313,35	313,34	0,02
	11	321,46	321,39	321,38	321,42	321,38	321,37	321,35	321,39	321,36	321,35	321,39	0,03
Penta E	7	375,39	375,30	375,31	375,39	375,31	375,31	375,31	375,39	375,31	375,38	375,34	0,04
	14	409,40	409,26	409,34	409,31	409,30	409,34	409,35	409,36	409,40	409,32	409,34	0,04
D16S539	9	94,94	94,90	94,86	94,92	94,86	94,88	94,92	94,86	94,90	94,88	94,89	0,03
	13	112,47	112,45	112,44	112,49	112,44	112,46	112,42	112,47	112,42	112,42	112,45	0,02
D18S51	16	166,53	166,58	166,50	166,51	166,55	166,53	166,51	166,46	166,48	166,54	166,52	0,03
	18	174,70	174,78	174,73	174,74	174,76	174,76	174,72	174,63	174,74	174,75	174,73	0,04
D2S1338	22	269,00	268,96	269,03	268,93	268,97	268,92	268,96	268,93	268,93	268,94	268,96	0,04
	25	281,12	281,10	281,10	281,06	281,10	281,08	281,09	281,04	281,06	281,07	281,08	0,02
CSF1PO	12	342,95	342,90	342,88	342,91	342,90	342,85	342,89	342,92	342,93	343,01	342,91	0,04
	12	342,95	342,90	342,88	342,91	342,90	346,84	342,89	342,92	342,93		343,35	1,31
Penta D	12	425,57	425,48	425,49	425,50	425,49	425,57	425,48	425,49	425,48	425,40	425,50	0,05
	13	430,93	430,86	430,81	430,80	430,82	430,83	430,80	430,77	430,77	430,74	430,81	0,05
TH01	6	78,35	78,29	78,29	78,34	78,28	78,29	78,30	78,29	78,30	78,30	78,30	0,02
	9,3	94,51	94,47	94,42	94,48	94,43	94,52	94,49	94,50	94,47	94,46	94,48	0,03
vWA	16	150,67	150,70	150,62	150,63	150,67	150,66	150,66	150,59	150,66	150,62	150,65	0,03
	19	161,94	161,98	161,95	162,03	162,02	161,92	162,00	161,94	162,00	161,97	161,98	0,04
D21S11	29	223,90	223,92	223,97	223,89	223,90	223,91	223,98	223,90	223,91	223,93	223,92	0,03
	31,2	234,12	234,13	234,12	234,11	234,09	234,12	234,11	234,12	234,11	234,10	234,11	0,01
D7S820	8	281,92	281,89	281,91	281,87	281,83	281,88	281,88	281,84	281,86	281,85	281,87	0,03
	11	293,94	294,03	293,97	293,93	293,97	293,98	293,99	293,94	293,92	294,00	293,97	0,03
D5S818	12	347,27	347,23	347,24	347,23	347,25	347,21	347,28	347,26	347,22	347,25	347,24	0,02
	12	347,27	347,23	347,24	347,23	347,25	347,21	347,28	347,26	347,22	347,25	347,24	0,02
TPOX	11	422,22	422,18	422,27	422,17	422,20	422,23	422,23	422,21	422,25	422,13	422,21	0,04
	11	422,22	422,18	422,27	422,17	422,20	422,23	422,23	422,21	422,25	422,13	422,21	0,04
DYS391	10	466,79	466,76	466,66	466,69	466,71	466,76	466,66	466,69	466,68	466,74	466,70	0,04
	10	466,79	466,76	466,66	466,69	466,71	466,76	466,66	466,69	466,68	466,74	466,70	0,04
D8S1179	14	102,43	102,42	102,37	102,38	102,37	102,42	102,35	102,36	102,35	102,41	102,39	0,03
	15	106,79	106,81	106,74	106,76	106,74	106,82	106,76	106,79	106,76	106,79	106,78	0,03
D12S391	18	150,96	151,06	150,99	151,00	150,96	150,95	150,94	150,88	151,02	150,97	150,97	0,05
	23	171,84	171,89	171,85	171,85	171,88	171,85	171,79	171,77	171,82	171,87	171,84	0,04
D19S433	13	222,29	222,27	222,34	222,33	222,28	222,31	222,30	222,29	222,32	222,36	222,36	0,03
	14	226,32	226,30	226,33	226,34	226,33	226,31	226,31	226,32	226,38	226,36	226,36	0,02
FGA	20	290,22	290,23	290,29	290,23	290,22	290,21	290,29	290,22	290,24	290,21	290,24	0,03
	23	301,78	301,74	301,78	301,72	301,78	301,75	301,75	301,70	301,75	301,80	301,76	0,03
D22S1045	16	456,73	456,70	456,69	456,74	456,72	456,77	456,72	456,67	456,68	456,74	456,72	0,03
	16	456,73	456,70	456,69	456,74	456,72	456,77	456,72	456,67	456,68	456,74	456,72	0,03
TOTAL DS												0,06	

Tabla 9. Lectura de una muestra de diente, medido en pares de bases con cinco réplicas.
Realizado, por analista (Tiempo 1).

MUESTRA DE DIENTE - REPET									
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	MEDIA	DS	CV
AMEL	X	79,03	78,95	79,09	79,04	79,04	79,03	0,05	0,06%
D3S1358	15	120,46	120,4	120,46	120,45	120,51	120,46	0,04	0,03%
	17	129,08	128,99	129,05	129,11	129,11	129,07	0,05	0,04%
D1S1656	11	164,56	164,55	164,58	164,56	164,58	164,57	0,01	0,01%
	12	168,67	168,63	168,63	168,62	168,71	168,65	0,04	0,02%
D2S441	10	216,6	216,6	216,6	216,61	216,51	216,58	0,04	0,02%
	12	224,68	224,73	224,74	224,75	224,75	224,73	0,03	0,01%
D10S1248	12	266,09	266,08	266,14	266,08	266,08	266,09	0,03	0,01%
	13	270,12	270,07	270,15	270,13	270,13	270,12	0,03	0,01%
D13S317	12	325,66	325,55	325,67	325,64	325,64	325,63	0,05	0,01%
	14	333,84	333,78	333,87	333,82	333,85	333,83	0,03	0,01%
Penta E	15	414,41	414,39	414,46	414,46	414,28	414,40	0,07	0,02%
	21	444,13	444,07	444,18	444,1	444,12	444,12	0,04	0,01%
D16S539	9	94,71	94,73	94,69	94,65	94,94	94,74	0,11	0,12%
	10	99,09	99,07	99,08	99,03	99,29	99,11	0,10	0,10%
D18S51	14	157,99	157,94	157,98	158,04	158,22	158,03	0,11	0,07%
	15	162,12	162,11	162,13	162,13	162,26	162,15	0,06	0,04%
D2S1338	23	272,86	272,84	272,9	272,85	272,85	272,86	0,02	0,01%
	26	284,85	284,88	284,93	284,89	284,9	284,89	0,03	0,01%
CSF1PO	12	343,01	342,92	343	343,03	342,88	342,97	0,06	0,02%
	13	347,1	347,04	347,13	347,1	347,05	347,08	0,04	0,01%
Penta D	10	415,2	415,15	415,2	415,24	415,25	415,21	0,04	0,01%
	14	435,89	435,88	435,97	435,95	436,06	435,95	0,07	0,02%
TH01	6	77,99	77,96	77,98	78,01	78,01	77,99	0,02	0,03%
vWA	16	150,54	150,48	150,48	150,51	150,57	150,52	0,04	0,03%
	17	154,63	154,61	154,66	154,69	154,72	154,66	0,04	0,03%
D21S11	29	223,9	223,93	223,89	223,87	223,93	223,90	0,03	0,01%
	30	227,99	228,01	228,01	227,96	228,03	228,00	0,03	0,01%
D7S820	10	289,84	289,86	289,89	289,93	290	289,90	0,06	0,02%
D5S818	11	343,21	343,13	343,2	343,23	343,27	343,21	0,05	0,01%
	12	347,36	347,32	347,33	347,36	347,44	347,36	0,05	0,01%
TPOX	8	410,06	410,05	410,13	410,14	410,05	410,09	0,05	0,01%
	11	422,21	422,21	422,24	422,26	422,15	422,21	0,04	0,01%
D8S1179	13	97,84	97,8	97,84	97,81	97,92	97,84	0,05	0,05%
	14	102,19	102,17	102,21	102,17	102,31	102,21	0,06	0,06%
D12S391	18	150,86	150,81	150,8	150,89	150,89	150,85	0,04	0,03%
	22	167,64	167,58	167,6	167,68	167,71	167,64	0,05	0,03%
D19S433	13	222,48	222,46	222,46	222,49	222,48	222,47	0,01	0,01%
	15	230,53	230,49	230,5	230,49	230,56	230,51	0,03	0,01%
FGA	20	290,41	290,39	290,4	290,43	290,43	290,41	0,02	0,01%
	21	294,25	294,23	294,27	294,28	294,28	294,26	0,02	0,01%
D22S1045	15	453,64	453,61	453,63	453,58	453,73	453,64	0,06	0,01%
TOTAL CV									0,03%

Tabla 10. Lectura de una muestra de diente, medido en pares de bases con cinco réplicas.

MUESTRA DE DIENTE -REPROD									
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	MEDIA	DS	CV
AMEL	X	79,02	79	78,95	79,02	79,05	79,01	0,04	0,05%
	Y	85,25	85,2	85,17	85,18	85,21	85,20	0,03	0,04%
D3S1358	15	120,46	120,4	120,4	120,46	120,45	120,43	0,03	0,03%
D1S1656	16	184,89	184,91	184,94	184,96	184,92	184,92	0,03	0,01%
	17	189,02	188,96	188,96	189,02	189,03	189,00	0,03	0,02%
D2S441	13	228,85	228,85	228,83	228,8	228,84	228,83	0,02	0,01%
	14	232,97	232,97	232,93	232,94	233	232,96	0,03	0,01%
D10S1248	14	274,15	274,05	274,12	274,15	274,05	274,10	0,05	0,02%
	15	278,09	278,01	278,06	278,1	278,05	278,06	0,04	0,01%
D13S317	11	321,52	321,45	321,45	321,5	321,49	321,48	0,03	0,01%
	12	325,53	325,48	325,48	325,53	325,52	325,51	0,03	0,01%
Penta E	12	400,07	400	400	400,07	400	400,03	0,04	0,01%
	20	439,1	439,06	439,03	439,08	439	439,05	0,04	0,01%
D16S539	9	94,69	94,6	94,61	94,62	94,66	94,64	0,04	0,04%
	10	99,08	99	98,93	99,02	99,04	99,01	0,06	0,06%
D18S51	12	149,56	149,58	149,55	149,63	149,61	149,59	0,03	0,02%
	14	157,98	157,93	157,94	158,05	157,98	157,98	0,05	0,03%
D2S1338	17	248,23	248,23	248,17	248,22	248,23	248,22	0,03	0,01%
	20	260,55	260,48	260,48	260,58	260,49	260,52	0,05	0,02%
CSF1PO	11	338,86	338,8	338,84	338,9	338,85	338,85	0,04	0,01%
	13	347,08	347,03	347,04	347,06	347,03	347,05	0,02	0,01%
Penta D	10	415,24	415,22	415,22	415,2	415,27	415,23	0,03	0,01%
	13	430,65	430,56	430,62	430,66	430,74	430,65	0,07	0,02%
TH01	6	77,98	77,94	77,89	77,98	78,02	77,96	0,05	0,06%
	7	82,36	82,33	82,25	82,29	82,32	82,31	0,04	0,05%
vWA	16	150,47	150,45	150,48	150,48	150,5	150,48	0,02	0,01%
	18	158,76	158,73	158,74	158,76	158,74	158,75	0,01	0,01%
D21S11	30	228	227,97	228,02	227,95	228,02	227,99	0,03	0,01%
D7S820	8	281,82	281,75	281,79	281,79	281,78	281,79	0,03	0,01%
	11	293,9	293,92	293,89	293,87	293,91	293,90	0,02	0,01%
D5S818	10	339,12	339,08	339,11	339,1	339,11	339,10	0,02	0,00%
	11	343,17	343,16	343,18	343,18	343,17	343,17	0,01	0,00%
TPOX	8	410,1	410,05	410,05	410,06	410,05	410,06	0,02	0,01%
	11	422,2	422,15	422,22	422,24	422,2	422,20	0,03	0,01%
DYS391	10	466,45	466,46	466,42	466,54	466,48	466,47	0,04	0,01%
D8S1179	10	84,59	84,53	84,51	84,52	84,57	84,54	0,03	0,04%
	13	97,84	97,8	97,74	97,77	97,81	97,79	0,04	0,04%
D12S391	18	150,8	150,79	150,81	150,87	150,82	150,82	0,03	0,02%
	24	175,7	175,65	175,67	175,7	175,72	175,69	0,03	0,02%
D19S433	12	218,49	218,42	218,44	218,42	218,47	218,45	0,03	0,01%
	13	222,46	222,45	222,45	222,46	222,49	222,46	0,02	0,01%
FGA	24	305,9	305,86	305,85	305,87	305,85	305,87	0,02	0,01%
D22S1045	15	453,59	453,61	453,6	453,63	453,69	453,62	0,04	0,01%
	16	456,51	456,6	456,58	456,66	456,59	456,59	0,05	0,01%
							TOTAL CV		0,02%

Del mismo modo que en el tejido óseo, se considera que los resultados obtenidos para las muestras dentales, cumplen con los parámetros de validación: los marcadores genéticos del kit son específicos para humanos, para el análisis de las muestras se puede determinar un umbral de

detección de alelos verdaderos por encima de 17,8 URF, la variación en la lectura en pares de bases se encuentra en el rango de aceptación, lo que significa que la asignación alélica es correcta y los métodos se consideran precisos pues poseen un coeficiente de variación menor al 10%.

4.4 Extracción de ADN a través del método de perlas magnéticas (*ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit*)

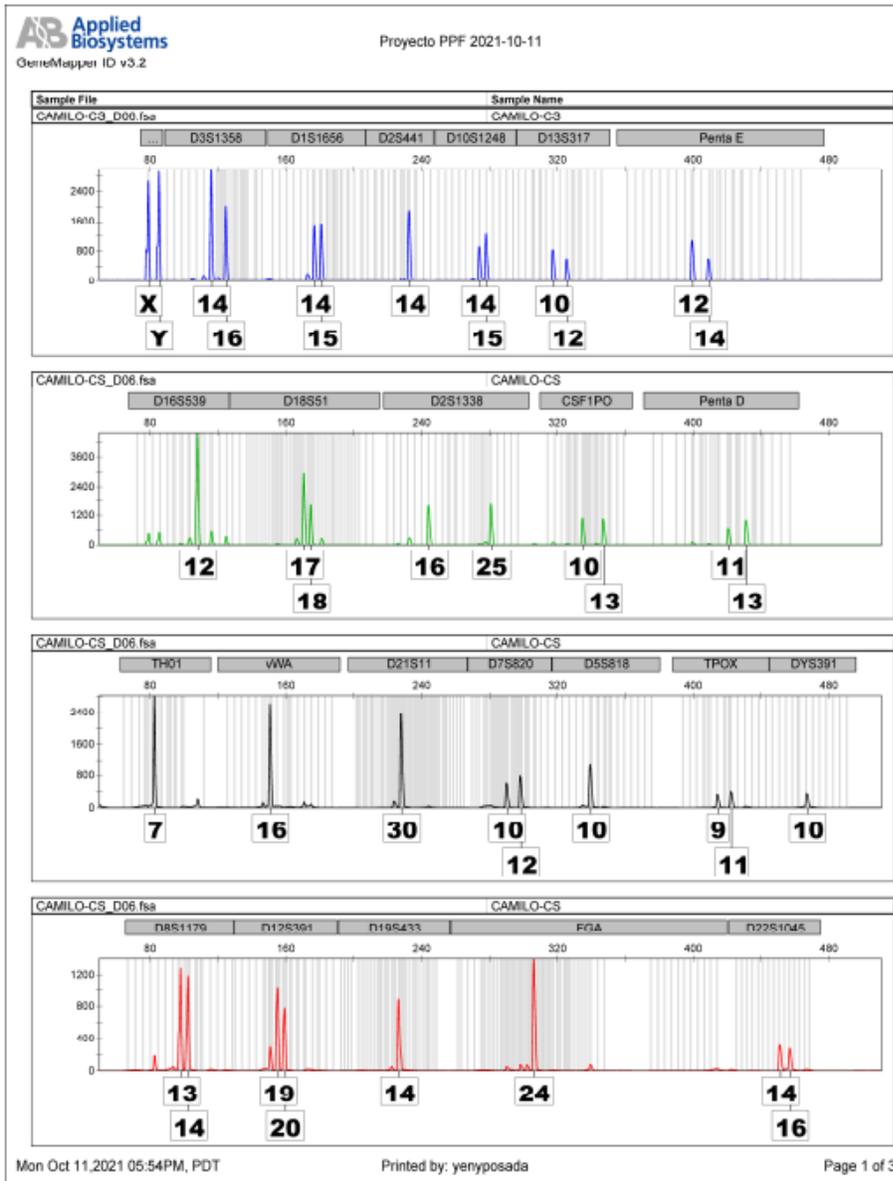


Ilustración 4. Electroferograma obtenido a partir de la extracción de ADN con el método de perlas magnéticas en piezas dentales temporales

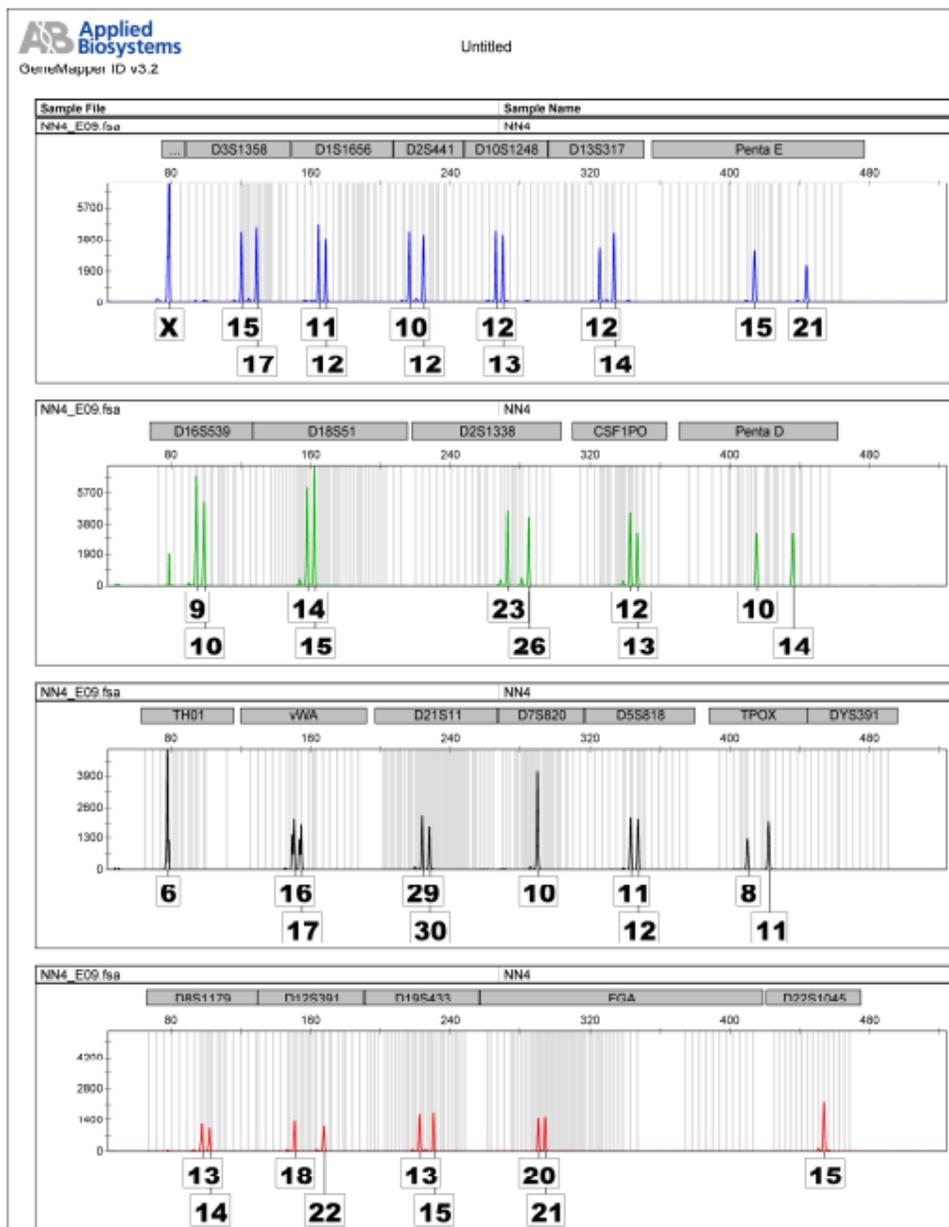


Ilustración 5. Electroferograma obtenido a partir de la extracción de ADN con el método de perlas magnéticas en piezas dentales permanentes

los perfiles que se observan en las ilustraciones 2 y 3 corresponden a la tipificación a partir de piezas dentales (temporales y permanentes) respectivamente a través del método de perlas magnéticas; como se puede observar son perfiles libres de artefactos de amplificación, con picos bien definidos.

5. Discusión

5.1. Estandarización

Cómo se mencionó en los resultados, para la estandarización de restos óseos se determinó el tiempo y temperatura óptima de digestión de las muestras como se muestra en la tabla 2. La muestra A siempre arrojó mayor cantidad de material genético que la muestra B, esto puede deberse a varios factores como lo son la antigüedad de la muestra y las condiciones de entierro de la misma, información que si bien el laboratorio posee, no fue relevantes en este proyecto; pues el interés trabajar con perfiles “limpios” (sin artefactos de amplificación) independientemente de la procedencia; además, si bien la concentración de ADN podría parecer baja en relación a lo obtenido en matrices convencionales, ya previamente fue establecido por el fabricante que la concentración ideal de ADN recomendada debe estar entre 0.25 a 0.5 ng/μl para este tipo de matrices, es por esto que aun con la diferencia en las concentraciones fue posible tipificar todos los extractos sin inconveniente y también la decisión de elegir un rango de tiempo y temperatura sobre otro se basó más en la practicidad del proceso y en el hecho de que se necesitaban rangos amplios de tiempo para poder procesar la muestra tranquilamente de un día para otro.

En el caso de los dientes, conociendo la similaridad estructural de las matrices y teniendo en cuenta la cantidad de material obtenido tras la pulverización, se determinó realizar la digestión en los mismos rangos de tiempo y temperatura que los restos óseos. con la diferencia de que debido a que al moler la pieza dental completa se recupera mucho menos polvo, se utilizó un menor volumen de EDTA para los lavados durante la decalcificación y la lisis, decisión que se determinó favorable al lograr obtener extractos con concentración de ADN suficiente para la tipificación.

5.2 Validación

Los ensayos de validación se realizaron tal cual están descritos en el manual de procedimientos de validación y verificación de métodos analíticos (P-SE-14) del laboratorio y los resultados obtenidos demuestran que los métodos son óptimos para su uso en matrices mineralizadas. Sin embargo, es importante recalcar qué parte del éxito de una tipificación, recae no sólo en el método utilizado durante la extracción de ADN sino en todo el procesamiento previo de la muestra; es importante

reconocer que la antigüedad de la muestra, las condiciones de entierro, la manipulación previa y durante el laboratorio influyen en el proceso de extracción y posterior amplificación del ADN.

5.3 Dificultades en la aplicación del método.

También se hace necesario mencionar, que, si bien el método de extracción a través de columnas de sílice es eficaz en la obtención de material genético de suficiente calidad y cantidad para los procesos comparativos en los casos de identificación o filiación, el utilizarlo con muestras complejas como los restos óseos y las piezas dentales, implica tener en cuenta, que la propia estructura de las matrices puede convertirse en un posible obstáculo para la amplificación. Tanto los huesos como los dientes están constituidos en su mayor parte, por una matriz mineralizada con altas concentraciones de calcio, magnesio y fósforo que recubren una matriz orgánica, cuyo principal componente es el colágeno. Esta composición, hace que extraer el material genético, ya sea de las células de la cámara pulpar (dientes) o de los osteoblastos (huesos), implique el riesgo de extraer también inhibidores de la PCR, por lo que se hace necesario, contar con un paso de decalcificación o eliminación de sales y una posterior concentración del ADN, para asegurar extractos que permitan la tipificación. Estos dos pasos, previos a la purificación y elución del material genético, son la principal desventaja que posee el método, pues significan un mayor tiempo de procesamiento y equipos especiales que incrementa los costos del kit. Es por eso, que la implementación de metodologías nuevas, como lo fue la extracción a través de perlas magnéticas nos demuestra que es posible continuar desarrollando técnicas cada vez más eficaces para los análisis genéticos, explorar las ventajas de matrices no convencionales en la investigación forense, ampliar el alcance de las pruebas actuales y darle a los investigadores nuevas herramientas para afrontar casos complejos donde las muestras “clásicas” no estén disponibles o se encuentren en mal estado.

6. Conclusiones

6.1 QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN

Cómo se muestran en las tablas 6 y 7 extraídas de los informes de validación presentados a la ONAC el método de extracción de ADN QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN purification kit y el método de amplificación Powerplex Fusion son específicos, exactos y precisos para su uso en muestras provenientes de tejidos mineralizados. En ambos casos se alcanzaron todos los criterios establecidos en el manual de validación y tal cual cómo se expresan los informes se considera que los métodos permiten obtener perfiles genéticos de alta calidad y confiabilidad por lo que se declara su aptitud para uso en el Laboratorio de Identificación Genética – IdentiGEN de la Universidad de Antioquia.

Tabla 11. *Parámetros de evaluación y conclusiones de los ensayos de validación para restos óseos.*

Parámetros de validación a evaluar	Resultados	Conclusión
Especificidad	No se observa amplificado de los marcadores del kit PPF con muestras de Bovino.	Los marcadores genéticos del Kit PPF son específicos para amplificar muestras de origen humano.
Límite de detección Límite de cuantificación	LD: 8 URF LC: 17,8 URF	Para el análisis de muestras, se puede determinar un umbral de detección de alelos “verdaderos” por encima de 17,8 URF.
Exactitud	SD: 0,06 Muestra Interlaboratorio. SD: 0,04 C+ 2800M	La variación en la lectura en pares de bases se encuentra en el rango de aceptación de 0,01 a 0,5, lo que significa que la asignación alélica, para todos los marcadores, es correcta.
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)	Repetibilidad para todas las muestras CV TOTAL: 0,04% Reproducibilidad para todas las muestras CV TOTAL: 0,02%	Los métodos analizados son precisos, ya que el CV es menor del 10%.

Tabla 12. Parámetros de evaluación y conclusiones de los ensayos de validación para piezas dentales.

Parámetros de validación a evaluar	Resultados	Conclusión
Especificidad	No se observa amplificado de los marcadores del kit PPF con muestras de Bovino.	Los marcadores genéticos del Kit PPF son específicos para amplificar muestras de origen humano.
Límite de detección Límite de cuantificación	LD: 8 URF LC: 17,8 URF	Para el análisis de muestras, se puede determinar un umbral de detección de alelos “verdaderos” por encima de 17,8 URF.
Exactitud	SD: 0,06 Muestra Interlaboratorio. SD: 0,06 C+ 2800M	La variación en la lectura en pares de bases se encuentra en el rango de aceptación de 0,01 a 0,5, lo que significa que la asignación alélica, para todos los marcadores, es correcta.
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)	Repetibilidad para todas las muestras CV TOTAL: 0,03% Reproducibilidad para todas las muestras CV TOTAL: 0,02%	Los métodos analizados son precisos, ya que el CV es menor del 10%.

6.2 ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit

Al implementar el método ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit en la extracción de ADN de piezas dentales (tanto temporales como permanentes) se logra una optimización significativa en el tiempo de extracción y purificación del material genético (el proceso completo puede realizarse en aproximadamente 3 horas) en comparación a su análogo Qiaquick (el cual tarda entre 22-25 horas, no continuas). Adicionalmente, al no necesitar el paso de “concentración del ADN” en el método ChargeSwitch, es posible prescindir de los tubos Amicon®, lo que disminuye significativamente el costo del procedimiento. Por último, la calidad de los perfiles obtenidos (en comparación a las muestras de referencia y a los perfiles trabajados con Qiaquick), demuestran que la extracción por perlas magnéticas es suficiente para obtener una cantidad y calidad de ADN óptimos para un proceso de identificación, representando así una técnica de gran utilidad en los laboratorios forenses. Especialmente en el campo de la identificación post-mortem, pues el análisis

de restos óseos y de piezas dentales (más allá de la individualización por carta dental) constituye una fuente de información invaluable y robusta para los procesos jurídico-penales.

7. Recomendaciones

En pro de mejorar las técnicas de análisis dentro del campo forense, es necesario reconocer las limitaciones actuales de los métodos de extracción y del procesamiento de matrices complejas y continuar buscando formas para optimizar los procesos y disminuir los costos, logrando que sean más eficientes en cuanto a tiempo de procesamiento y con una mejor relación costo beneficio, que permita poner estos métodos a disposición de la comunidad.

Así mismo, explorar las ventajas que pueden tener matrices no convencionales como lo son los tejidos mineralizados, sobre las muestras clásicas, en especial para casos “complejos”, puede ampliar el alcance de los métodos actuales, convirtiéndolos en herramientas precisas y efectivas que representen una solución ante las necesidades jurídicas de una sociedad que continúa construyendo el camino hacia la paz, tras mas de medio siglo de violencia.

Por último, no perder de vista la titánica tarea que tenemos los especialistas forenses de aportar en fortalecimiento de la justicia y el esclarecimiento de la verdad a través del refinamiento de nuestros saberes.

Referencias

- Alcalá - Espinoza, E. (2016). *Análisis de DNA en restos óseos antiguos*. 6.
- Alonso Alonso, A. (2011, diciembre). *ADN forense, investigación criminal y búsqueda de desaparecidos*. SEBBM. <https://web2020.sebbm.es/web/es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/310-adn-forense-investigacion-criminal-y-busqueda-de-desaparecidos>
- Amplificación de ADN kit comercial Powerplex Fusion (I-SE-12; p5)*. (2018). IdentiGEN; WORD.
- Autoridad forense estima que en Colombia hay unos 200.000 cuerpos sin identificar*. (2019, diciembre 17). France 24. <https://www.france24.com/es/20191217-autoridad-forense-estima-que-en-colombia-hay-unos-200-000-cuerpos-sin-identificar>
- Barrio-Caballero, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.11.002>
- Extracción de ADN por el método Qiaquick PCR Purification Kit a partir de muestras óseas (I-SE-09; p.7)*. (2017). IdentiGEN; WORD.
- Gómez Nadal, P., & Chato, P. (2017, marzo 15). *Ni profesionales ni plata para identificar miles de cuerpos*. Colombia Plural. <https://colombiaplural.com/actualidad/page/12/>
- Guía para la elaboración de las consideraciones éticas en la investigación con seres humanos/no humanos*. (s. f.). CEINCI. <https://www.unilibrebaq.edu.co/unilibrebaq/Ciul/documentos/COMITE/ModConsEticas.pdf>
- ISO - ISO/IEC 17025:2017—General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. (s. f.). International Organization for Standardization. Recuperado 24 de febrero de 2022, de <https://www.iso.org/standard/66912.html>
- Jiménez-Arce, G., & Morera-Brenes, B. (1999). Revisión sobre la extracción de ADN a partir de huesos humanos. *Medicina Legal de Costa Rica*, 16(1-2), 11-14.
- Sanabria Medina, C. (s. f.). *Patología y antropología de la muerte: La investigación científico-judicial de la muerte y la tortura, desde las fosas clandestinas, hasta la audiencia pública*. (2016.^a ed.). Forensic Publisher.

- Kitayama, T., Ogawa, Y., Fujii, K., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi, K., Kasai, K., Yurino, N., Yokoi, T., Fukuma, Y., Yamamoto, K., Oki, T., Asamura, H., & Fukushima, H. (2010). Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Legal Medicine*, 12(2), 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.12.004>
- Ley 721 de 2001—Gestor Normativo—Función Pública. (s. f.). Recuperado 24 de febrero de 2022, de <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=9565>
- Life: Datos de vida. (s. f.). Recuperado 26 de febrero de 2022, de <https://sirdec.medicinalegal.gov.co:38181/mapaDesaparecidos/faces/mapa.xhtml>
- Loreille, O., Diegoli, T., Irwin, J., Coble, M., & Parsons, T. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic science international. Genetics*, 1, 191-195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Narváz Caldas, J., & Ordoñez Ortiz, M. E. (2021). DESAFÍOS DE LA ANTROPOLOGÍA FORENSE Y SOCIAL EN LA IDENTIFICACIÓN HUMANA Y RESARCIMIENTO DE DERECHOS A LAS VÍCTIMAS DEL CONFLICTO ARMADO EN COLOMBIA. *Caribeña de Ciencias Sociales*, 63-79. <https://doi.org/10.51896/caribe/HEGB6547>
- Para hacer realidad la paz en Colombia se necesita consolidar la presencia del Estado en todo el país. (2021, abril 6). Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2021/04/1490512>
- Prieto, L. (s. f.). *Recomendaciones ISFG en la interpretación de mezclas* [..Pptx].
- Raimann, P. E., Picanço, J. B., Silva, D. S. B. S., Albuquerque, T. C. K., Paludo, F. J. O., & Alho, C. S. (2012). Procedures to recover DNA from pre-molar and molar teeth of decomposed cadavers with different post-mortem intervals. *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1459-1466. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.08.014>
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756-1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Sierra, W. U., Del Castillo-Sabogal, H., & Espitia-Ortiz, T. (2018). Protocolo unificado de digestión y descalcificación de tres métodos de extracción de ADN de restos humanos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(161), 447. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.527>

- Teobal, M. X., Alexander-Aguilera, A., Soto-Rodríguez, I., Lozada-García, A., & Barrientos-Salcedo, C. (2020). *Genetic analysis of three STR loci (TPOX, FGA, D18S51) in the population of Coyopolan, Veracruz, Mexico*. 9.
- Tomas, C., Børsting, C., & Morling, N. (2012). A 48-plex Autosomal SNP GenPlex™ Assay for Human Individualization and Relationship Testing. En A. Alonso (Ed.), *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics* (Vol. 830, pp. 73-85). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_6
- UBPD. (2020, febrero 12). *Los retos de la identificación de 25.000 cuerpos en Colombia*. <https://ubpdbusquedadesaparecidos.co/actualidad/los-retos-de-la-identificacion-de-25-000-cuerpos-en-colombia/>

Anexos

Tabla 13. Lectura de una muestra de resto óseo, medido en pares de bases con cinco réplicas.
Realizado por analista en t1

		MUESTRA DE RESTO ÓSEO - ANALISTA 1 -REPET							
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	MEDIA	DS	CV
AMEL	X	78,74	78,75	78,70	79,25	78,82	78,85	0,23	0,29%
	Y	84,92	84,96	84,96	85,45	85,02	85,06	0,22	0,26%
D3S1358	16	124,39	124,47	124,45	124,48	124,46	124,45	0,04	0,03%
	16	124,39	124,47	124,45	124,48	124,46	124,45	0,04	0,03%
D1S1656	11	164,31	164,72	164,33	164,66	164,39	164,48	0,19	0,12%
	18,3	195,81	196,17	195,86	196,14	195,89	195,97	0,17	0,09%
D2S441	10	216,16	216,64	216,16	216,62	216,29	216,37	0,24	0,11%
	15	236,68	237,19	236,71	237,14	236,83	236,91	0,24	0,10%
D10S1248	14	273,87	274,07	273,85	274,11	273,95	273,97	0,12	0,04%
	15	277,88	278,03	277,83	278,04	277,84	277,92	0,10	0,04%
D13S317	9	313,01	312,99	313,09	313,04	313,07	313,04	0,04	0,01%
	11	321,10	321,12	321,08	321,16	321,17	321,13	0,04	0,01%
Penta E	5	365,42	365,49	365,36	365,44	365,51	365,44	0,06	0,02%
	15	413,88	414,01	413,92	414,05	413,93	413,96	0,07	0,02%
D16S539	9	94,35	94,40	94,41	94,37	94,46	94,40	0,04	0,04%
	13	111,91	111,98	111,99	111,96	111,96	111,96	0,03	0,03%
D18S51	13	153,59	153,64	153,66	153,64	153,61	153,64	0,02	0,01%
	17	170,18	170,21	170,21	170,22	170,25	170,22	0,02	0,01%
D2S1338	23	272,67	272,66	272,64	272,70	272,71	272,68	0,03	0,01%
	23	272,67	272,66	272,64	272,70	272,71	272,68	0,03	0,01%
CSF1PO	11	338,61	338,63	338,63	338,67	338,65	338,64	0,02	0,01%
	11	338,61	338,63	338,63	338,67	338,65	338,64	0,02	0,01%
Penta D	9	410,02	410,03	410,09	410,33	410,06	410,11	0,13	0,03%
	12	425,14	425,21	425,28	425,51	425,34	425,30	0,14	0,03%
TH01	6	77,75	77,69	77,73	77,72	77,76	77,73	0,03	0,04%
	6	77,75	77,69	77,73	77,72	77,76	77,73	0,03	0,04%
vWA	15	146,38	146,30	146,52	146,47	146,49	146,43	0,09	0,06%
	18	158,69	158,63	158,63	158,56	158,57	158,62	0,05	0,03%
D21S11	27	215,57	215,56	215,53	215,59	215,58	215,57	0,02	0,01%
	30	227,78	227,74	227,73	227,76	227,74	227,75	0,02	0,01%
D7S820	8	281,55	281,59	281,60	281,66	281,64	281,61	0,04	0,02%
	10	289,60	289,65	289,71	289,67	289,70	289,67	0,04	0,02%
D5S818	11	343,02	343,06	342,98	343,00	342,92	343,00	0,05	0,02%
	12	347,08	347,07	347,07	347,07	347,06	347,07	0,01	0,00%
TPOX	8	409,89	410,03	409,96	410,06	409,99	409,99	0,07	0,02%
	8	409,89	410,03	409,96	410,06	409,99	409,99	0,07	0,02%
DYS391	9	462,54	462,92	462,57	462,82	462,57	462,68	0,17	0,04%
	9	462,54	462,92	462,57	462,82	462,57	462,68	0,17	0,04%
D8S1179	11	88,64	88,66	88,68	88,61	88,72	88,66	0,04	0,05%
	15	106,19	106,30	106,33	106,21	106,37	106,28	0,08	0,07%
D12S391	17,3	149,49	149,60	149,59	149,56	149,63	149,57	0,05	0,04%
	17,3	149,49	149,60	149,59	149,56	149,63	149,57	0,05	0,04%
D19S433	12	218,07	218,10	217,99	218,07	218,11	218,07	0,05	0,02%
	15	230,10	230,20	230,02	230,18	230,16	230,13	0,07	0,03%
FGA	20	290,12	290,27	290,15	290,24	290,21	290,20	0,06	0,02%
	21	294,05	293,99	294,04	294,06	294,01	294,03	0,03	0,01%
D22S1045	14	450,55	450,54	450,59	450,60	450,47	450,55	0,05	0,01%
	15	453,55	453,61	453,52	453,56	453,56	453,56	0,03	0,01%
							TOTAL CV		0,04%

Estandarización y validación de métodos de extracción y amplificación de ADN para tejidos mineralizados: restos óseos y piezas dentales.

Tabla 14. Lectura de una muestra de resto óseo, medido en pares de bases con cinco réplicas.

Realizado por analista en t2

		MUESTRA DE RESTO ÓSEO - ANALISTA 1 -REPRO							
MARCADOR	ALELO	1	2	3	4	5	MEDIA	DS	CV
AMEL	X	78,74	78,74	78,80	78,71	79.19	78,75	0,04	0,05%
	Y	84,98	84,96	85,04	84,99	85.4	84,99	0,03	0,04%
D3S1358	16	120,25	120,19	120,25	120,24	120.56	120,23	0,03	0,02%
	16	124,60	124,58	124,63	124,64	124.95	124,61	0,03	0,02%
D1S1656	11	176,69	176,71	176,72	176,71	176.96	176,71	0,01	0,01%
	18,3	195,90	195,91	195,91	195,91	196.2	195,91	0,00	0,00%
D2S441	10	216,09	216,10	216,16	216,11	216.52	216,12	0,03	0,01%
	15	224,33	224,32	224,39	224,34	224.69	224,35	0,03	0,01%
D10S1248	14	269,78	269,83	269,87	269,81	270.12	269,82	0,04	0,01%
	15	273,83	273,82	273,84	273,79	274.14	273,82	0,02	0,01%
D13S317	9	321,12	321,11	321,18	321,04	321.51	321,11	0,06	0,02%
	11	325,19	325,19	325,25	325,12	325.56	325,19	0,05	0,02%
Penta E	5	399,43	399,36	399,43	399,37	399.94	399,40	0,04	0,01%
	15	399,43	399,36	399,43	399,37	399.94	399,40	0,04	0,01%
D16S539	9	107,60	107,61	107,66	107,63	108.35	107,63	0,03	0,02%
	13	107,60	107,61	107,66	107,63	108.35	107,63	0,03	0,02%
D18S51	13	149,50	149,49	149,54	149,58	149.78	149,53	0,04	0,03%
	17	170,30	170,30	170,33	170,34	170.51	170,32	0,02	0,01%
D2S1338	23	276,64	276,66	276,68	276,66	276.89	276,66	0,02	0,01%
	23	280,70	280,65	280,71	280,70	280.92	280,69	0,03	0,01%
CSF1PO	11	334,51	334,51	334,54	334,47	334.77	334,51	0,03	0,01%
	11	342,66	342,50	342,67	342,60	342.92	342,61	0,08	0,02%
Penta D	9	415,23	415,15	415,22	415,23	415.4	415,21	0,04	0,01%
	12	420,29	420,19	420,22	420,26	420.41	420,24	0,04	0,01%
TH01	6	86,49	86,49	86,55	86,54	86.9	86,52	0,03	0,04%
	6	90,84	90,80	90,94	90,89	91.23	90,87	0,06	0,07%
vWA	15	146,24	146,19	146,22	146,28	146.55	146,23	0,04	0,03%
	18	150,37	150,37	150,40	150,42	150.71	150,39	0,02	0,02%
D21S11	27	227,69	227,73	227,67	227,69	227.97	227,70	0,03	0,01%
	30	237,91	237,91	237,97	237,95	238.19	237,94	0,03	0,01%
D7S820	8	289,72	289,75	289,73	289,73	290.0	289,73	0,01	0,00%
	10	293,77	293,74	293,75	293,77	294.03	293,76	0,01	0,01%
D5S818	11	343,03	343,01	343,04	343,03	343.29	343,03	0,01	0,00%
	12	343,03	343,01	343,04	343,03	343.29	343,03	0,01	0,00%
TPOX	8	410,00	410,01	410,12	410,05	410.23	410,05	0,05	0,01%
	8	418,10	418,01	418,03	418,02	418.22	418,04	0,04	0,01%
DYS391	9	470,59	470,60	470,65	470,59	470.59	470,59	0,01	0,00%
	9	470,59	470,56	470,65	470,59	470.59	470,58	0,02	0,00%
D8S1179	11	93,10	93,09	93,19	93,13	93.48	93,13	0,04	0,05%
	15	101,85	101,81	101,90	101,88	102.23	101,86	0,04	0,04%
D12S391	17,3	154,79	154,78	154,87	154,86	155.17	154,83	0,05	0,03%
	17,3	167,52	167,49	167,57	167,51	167.82	167,52	0,03	0,02%
D19S433	12	228,06	228,04	228,04	228,05	228.46	228,05	0,01	0,00%
	15	230,07	230,08	230,05	230,03	230.51	230,06	0,02	0,01%
FGA	20	294,07	294,04	293,99	294,01	294.33	294,03	0,03	0,01%
	21	301,77	301,73	301,82	301,74	302.03	301,77	0,04	0,01%
D22S1045	14	453,61	453,69	453,64	453,61	453.68	453,64	0,04	0,01%
	15	456,60	456,63	456,66	456,60	456.73	456,62	0,03	0,01%
							TOTAL CV		0,02%

- Consentimiento informado para la recolección de piezas dentales: <..\Downloads\Consentimiento informado Réstos Óseos-Diente.xlsx>
- Informe de validación para restos óseos: <PROYECTO FORENSE\RESULTADOS\F-SE-32 Informe de validación Qiaquick PPF 2021.pdf>
- Informe de validación para piezas dentales: <PROYECTO FORENSE\RESULTADOS\DIENTES\F-SE-32 Informe de validación DIENTES Qiaquick 2021.pdf>
- Nota “Genética para el duelo, el derecho por ser familia” realizada para el periódico Alma Mater, tras la acreditación del laboratorio en 2021 <https://bit.ly/IdentiGen-PAM712>
- XVI Congreso colombiano y X Congreso Internacional de genética humana <..\Downloads\Memorias Charge Swicht Purification Kit como alternativa en la extraccion de ADN dental .pdf>
- Presentación de pptx sobre el uso de Charge Swicht como alternativa a la extracción de ADN dental <..\Downloads\Charge Switch como alternativa a la extracción de ADN dental.pptx.pdf>