

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación y optimización de un kit comercial para la amplificación de 12 STR del cromosoma X en el laboratorio acreditado ISO 17025 de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) en la Ciudad de Guatemala

Trabajo de graduación
presentado por
Andrea Vanessa Gómez Barillas
para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2016

Validación y optimización de un kit comercial para la amplificación de 12 STR del cromosoma X en el laboratorio acreditado ISO 17025 de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) en la Ciudad de Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



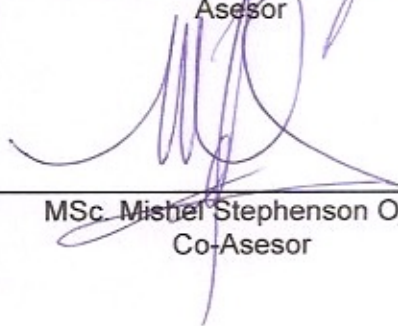
Validación y optimización de un kit comercial para la amplificación de 12 STR del cromosoma X en el laboratorio acreditado ISO 17025 de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) en la Ciudad de Guatemala

Trabajo de graduación
presentado por
Andrea Vanessa Gómez Barillas
para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

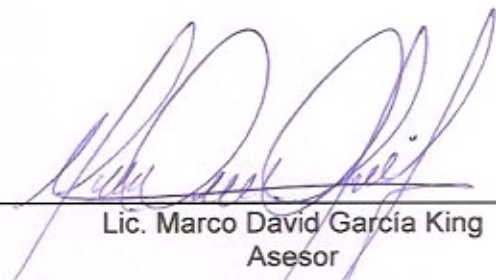
Guatemala
2016

Vo. Bo. :

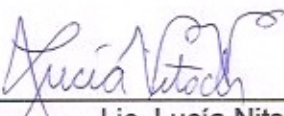
(f) 
Lic. Marco David García King
Asesor

(f) 
MSc. Mishel Stephenson Ojea
Co-Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
Lic. Marco David García King
Asesor

(f) 
MSc. Mishel Stephenson Ojea
Co-Asesor

(f) 
Lic. Lucía Nitsch Velazquez
Directora Bioquímica y Microbiología

Fecha de aprobación: Guatemala, 04 de enero de 2016 ✓

AGRADECIMIENTOS

*«Desarrolla una actitud de gratitud, da gracias por todo lo que te sucede, sabiendo que cada paso que das te va a llevar a lograr algo mejor»
– Bryan Tracy*

Quisiera agradecer, en primer lugar, a Dios por darme la bendición de poder estudiar y por permitirme terminar este trabajo exitosamente. Agradecer a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano, y a mis compañeras, Michelle y Patty, quienes han estado allí para mí en todo momento y que con sus palabras de aliento me han ayudado a salir adelante.

También deseo agradecer a la Fundación de Antropología Forense de Guatemala por permitirme realizar este trabajo con ellos, por brindarme los recursos tanto materiales como intelectuales que me permitieron terminar esta tarea. A mis asesores Marco y Mishel por su orientación, apoyo y motivación que me brindaron durante este proceso. También quisiera hacer un reconocimiento especial a: Sofía, Mariana, Andrea, Wendy y a todos con los que trabajé en el Laboratorio de Genética de la FAFG por su ayuda, consejos, colaboración y cariño que me mostraron durante estos dos años que estuve trabajando con ellos.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	vii
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE ANEXOS	viii
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. JUSTIFICACIÓN	4
III. OBJETIVOS	6
A. Objetivo general:.....	6
B. Objetivos específicos:	6
IV. MARCO TEÓRICO	7
A. Situación forense actual en Guatemala.....	7
B. Pruebas genéticas en estudios forenses	7
C. Extracción de ADN.....	11
D. Análisis molecular de muestras forenses	13
E. Electroferogramas.....	15
F. Kits utilizados en genética forense.....	16
G. Investigator Argus X-12	18
H. Validación de métodos	19
V. MARCO METODOLÓGICO.....	21
A. Fase preliminar	22
B. Fase de validación	23
C. Análisis de datos	25
D. Consideraciones éticas.....	27
VI. RESULTADOS	28
A. Fase preliminar	28
B. Fase de validación	31
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
A. Fase preliminar	41
B. Fase de validación	43
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. RECOMENDACIONES.....	53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
XI. CONTACTOS	58
XII. ANEXOS.....	59

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de una reacción PCR multiplex	8
Figura 2. Comparación de las técnicas de extracción de ADN por soluciones orgánicas, Chelex y tarjetas FTA	12
Figura 3. Ideograma de la distribución de las regiones de amplificación en el cromosoma X.....	18
Figura 4: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 25 ciclos con reacción completa, en los analizadores genéticos 3130 y 3130xl	28
Figura 5: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 24 ciclos con reacción completa y cuartos de reacción, en el analizador genético 3130	29
Figura 6: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 23 ciclos con reacción completa, en los analizadores genéticos 3130 y 3130xl	29
Figura 7: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de evidencia a distintas concentraciones amplificadas por una PCR de 25 y 27 ciclos con reacción completa, en el analizador genético 3130 a la condición de inyección 3kV y 15 s.	30
Figura 8: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de evidencia a distintas concentraciones amplificadas por una PCR de 25 y 27 ciclos con reacción completa, en el analizador genético 3130xl a la condición de inyección 3kV y 22s.....	30
Figura 9: Balance de picos heterocigotos para las muestras de sangre, a siete concentraciones, fijadas en tarjetas FTA a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl.....	35
Figura 10: Balance de picos heterocigotos para las muestras extraídas por Chelex®, a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl	35
Figura 11: Balance de picos heterocigotos para las muestras de saliva, a siete concentraciones, fijadas en tarjetas FTA a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl	36
Figura 12: Balance de picos heterocigotos para los extractos de evidencia, a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl	36
Figura 13: Balance de picos heterocigotos para los extractos de muestras esqueléticas a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl	37

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de PCR de acuerdo al número de copias	23
Cuadro 2: Parámetros de análisis definidos para distintas condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl	31
Cuadro 3: Límites superior e inferior para cada tipo de muestra a distintas condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl	32
Cuadro 4: Concentración ideal para cada tipo de muestras a diferentes condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl	33
Cuadro 5: PHR aceptados para las muestras de evidencia y esqueléticas para cada condición de inyección en el analizador genético 3130xl	34
Cuadro 6: Altura de picos del estándar de tamaño dependiendo de la cantidad de BTO añadida a las escaleras alélicas, a diferentes condiciones de inyección.	38
En el cuadro 7 se muestra la proporción entre los picos reales y los picos de tartamudeo que se observan para todos los tipos de muestra a diferentes condiciones de inyección. Se muestra además la altura promedio de los picos reales y de los del tartamudeo.....	37
Cuadro 7: Altura de picos reales y picos de tartamudeo y la proporción entre los mismos a diferentes condiciones de inyección	37
Cuadro 8: Alelos amplificados del contribuyente mayoritario y minoritario a diferentes proporciones y condiciones de inyección	39
Cuadro 9: Proporción de altura de los alelos observados para el contribuyente mayoritario y minoritario a diferentes condiciones de inyección.....	39

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado utilizado para la toma de las muestras de referencia utilizadas para la validación.....	59
ANEXO 2. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala para la realización del proyecto.....	61
ANEXO 3: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos observados para las muestras de referencia, esqueléticas y de evidencia a diferentes concentraciones y condiciones de inyección.....	63
ANEXO 4: Balance de heterocigotos para muestras referenciales, esqueléticas y de evidencia a diferentes concentraciones y condiciones de inyección.....	67

RESUMEN

En algunos casos de identificaciones, filiaciones y paternidades y la información disponible no es suficiente para llevar a cabo una coincidencia con ADN por lo que es necesario realizar pruebas adicionales que generen más información. Este trabajo de graduación, por lo tanto, tiene como objetivo principal la estandarización y validación de una metodología para la amplificación de marcadores STRs humanos en muestras de tejidos de evidencia (muestras esqueléticas, sangre, semen y cabello) y referencia (sangre e hisopados bucales) de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala, utilizando el kit Investigator Argus X-12. Entre los objetivos específicos de dicha estandarización se encontraba establecer las condiciones óptimas de amplificación y de inyección para las muestras esqueléticas, de evidencia y referenciales. Además de determinar los umbrales de detección, parámetros de análisis y tanto la repetitividad como la reproducibilidad de los resultados obtenidos por medio del kit Investigator Argus X-12.

Se determinó que para muestras esqueléticas y de evidencia la amplificación óptima se consigue con un programa de PCR de 27 ciclos y condiciones de inyección de 3kv 10s, 3kv 15s y 3kv 20s. Por otra parte para las muestras de referencia debe utilizarse un programa de PCR de 23 ciclos bajo las mismas condiciones de inyección. Entre otras pruebas realizadas durante la optimización se estableció un rango ideal de concentración para cada tipo de muestras, ya sea fijadas en tarjetas FTA o en extractos de ADN. Se comprobó la repetitividad y reproducibilidad de los resultados en distintos termocicladores para el analizador genético 3130. Además se determinó un umbral de análisis de 20URF para las condiciones de inyección de 3kv 10s, 3kv 15s y 3kv 20s, un umbral estocástico de 140 URF (3kv 10s), 220 URF (3kv 15s) y 300 URF (3kv20s) y un tartamudeo negativo de 8% para este kit. Por último se estableció que hasta en una proporción de 3:1 se obtiene un perfil significativo del contribuyente minoritario en una mezcla. Se recomienda además una evaluación de la reproducibilidad de los resultados en el analizador genético 3130xl, también presente en el Laboratorio de Genética de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

La Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) es una organización no gubernamental, autónoma, técnico-científica y sin fines de lucro que investiga casos de violaciones a los derechos humanos ocurridas durante el conflicto armado interno en Guatemala (USC Shoah, 2014). Se encarga además de realizar investigaciones científicas y forenses que buscan la documentación y divulgación de casos de muerte no esclarecidos y búsqueda de víctimas de desaparición forzada (FAFG, 2014). Para finales de 2014, de las investigaciones realizadas los años de 1992 a 2010, la FAFG había reportado 1169 casos relacionados al conflicto armado interno y 170 casos no relacionados a este (FAFG, 2014). Adicionalmente, el laboratorio de genética también maneja paternidades y filiaciones independientes. Y en algunas ocasiones también se encargan de casos de criminalidad común (FAFG, 2014).

La FAFG es una institución multidisciplinaria, por lo que cuenta con diversas áreas técnicas, entre estas el Laboratorio de Genética Forense. Este fue creado por la necesidad de identificar a las víctimas del conflicto armado cuando no era posible hacerlo por otras disciplinas. Por tal razón, este se especializó en el análisis genético de muestras de osamentas, sin embargo es capaz de analizar cualquier tipo de muestra forense. Además de trabajar con muestras de restos óseos y dentales, el laboratorio puede procesar muestras con otro tipo de material biológico presente (por ejemplo sangre, semen, saliva, cabellos) así como muestras de referencia colectadas de donantes conocidos. Las muestras forenses de evidencia pueden presentar dificultades debido a que han sido expuestas a condiciones ambientales que las puede degradar, o puede no haber suficiente ADN disponible (Butler, 2010). Otra dificultad que presenta este tipo de muestras es la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación por PCR presentes en la muestra.

En la actualidad, el análisis de marcadores STR (*short tandem repeats*) del ADN es la metodología más utilizada en las ciencias forenses a nivel mundial, ya que estos presentan

varias ventajas que facilitan la identificación de personas. En varias regiones alrededor del mundo se han establecido grupos de regiones STR para poder utilizarlos de forma estandarizada; tal es el caso de los 13 marcadores STR determinados por el FBI (Federal Bureau of Investigation) y que conforman el CODIS (*Combined DNA Index System*) los cuales son evaluados en las evidencias y muestras procesadas en los Estados Unidos.

En el campo de la identificación humana, se obtienen coincidencias al comparar los perfiles genéticos obtenidos entre dos muestras, ya sea del mismo donante o de familiares del mismo, por el análisis de la combinación de varios marcadores STR, comparación que va acompañada de un resultado estadístico, expresado como un índice de verosimilitud. Este resultado en combinación con información adicional no relacionada al ADN debe dar como resultado una probabilidad de identificación que pueda llevar a una conclusión certera, normalmente 99%, 99.9% o 99.99% (Edelmann *et. al*, 2004). Sin embargo existen casos deficientes en los cuales no se cuenta con familiares directos o casos en los que la muestra no genera perfiles completos y que por lo tanto no se alcanza el mínimo de índice de verosimilitud para una identificación (Cainé, 2011).

Surge entonces la necesidad de implementar métodos adicionales que permitan mejorar la certeza de una identificación. Entre estas metodologías se encuentran el análisis de marcadores STR del cromosoma Y, secuenciación de ADN mitocondrial, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y marcadores STR del cromosoma X. Este último, permite la amplificación de regiones que son heredadas por las mujeres tanto del padre como de la madre, y en los hombres únicamente de la madre (Edelmann *et. al*, 2004). En el presente proyecto se propone estandarizar y validar un protocolo para la utilización del kit de amplificación de STRs *Investigator Argus-X12* (QIAGEN, Alemania) en muestras de evidencia y muestras referenciales para su utilización en el Laboratorio de Genética Forense de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala.

II. JUSTIFICACIÓN

La Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) lleva a cabo identificaciones de víctimas de desapariciones forzadas ocurridas durante el conflicto armado interno. Para ello colectan muestras de osamentas en los lugares en los cuales se han identificado fosas comunes de esa época. Simultáneamente colectan muestras de familiares de personas desaparecidas, hisopado bucal o sangre, que se utilizan para la comparación genética y así realizar las identificaciones. La FAFG también trabaja con casos independientes de paternidades y filiaciones utilizando las mismas técnicas moleculares que se utilizan en las identificaciones. Para los casos de criminalidad común, es necesario en algunas ocasiones, utilizar muestras de evidencia como semen y cabello. Sin embargo, algunos de los casos son considerados como deficientes debido a la ausencia de familiares directos que puedan aportar muestras o a la mala calidad (degradación o inhibición) de los resultados obtenidos de los restos óseos y dentales. De acuerdo a Filho y colaboradores (2013) en ausencia de estos familiares directos, generalmente se toman muestras de familiares no directos, lo cual causa que las probabilidades de compartir las regiones de secuencias cortas repetidas en tándem (STR, por sus siglas en inglés Short Tandem Repeats) autosómicas se reduzcan en aproximadamente 50% (Pinto, 2013), dificultando así que se alcance de la probabilidad de identificación mínima necesaria para considerar una identificación concluyente.

Debido a esto, el 5% de los casos de paternidad, 8% de identificaciones de desaparecidos en el conflicto armado interno y 16% de las pruebas de filiación (para determinar si dos personas son familiares) quedan inconclusos (no alcanzan el índice de verosimilitud necesario para confirmar una identificación). Por lo tanto para la FAFG es necesario contar con herramientas adicionales que contribuyan con aportar evidencia concluyente para una identificación. Entre estos un kit que permita la amplificación de regiones STR del cromosoma X que aporten

resultados que sean de utilidad en la evaluación de los casos de coincidencias deficientes. El kit *Investigator Argus X-12* (Qiagen¹, Alemania) permite la amplificación de 12 regiones STR de dicho cromosoma, más la región de la Amelogenina, De acuerdo a Cainé y colaboradores (2011) el uso de este kit incrementa hasta en aproximadamente 7% el índice de verosimilitud cuando se utiliza en conjunto el perfil autosómico con el perfil obtenido del cromosoma X.

El Laboratorio de Genética Forense de la FAFG se encuentra acreditado COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025, OGA-LE-033-09. Por lo tanto, todos los protocolos y ensayos a utilizar dentro del mismo deben de pasar por un proceso de validación interna. Adicional a eso, a pesar de que este kit está diseñado para su uso en muestras forenses, no fue diseñado específicamente para muestras óseas o dentales, las cuales son de alta dificultad debido a su naturaleza, y por lo tanto es necesario optimizar las condiciones adecuadas con las cuales se obtengan los mejores resultados.

La validación de este kit en las condiciones establecidas permitirá su uso en todos los tipos de muestras, incluyendo muestras óseas y dentales, que constituye el único material con el que cuenta la FAFG para la identificación de restos humanos en una gran cantidad de casos. Debido a que diversos factores presentes en las muestras pueden afectar el desempeño del kit, es necesario determinar si las condiciones en las que se encuentran permiten que éste amplifique las 13 regiones de interés. Además, la estandarización de este kit le permitiría a la FAFG contar con una herramienta más para realizar identificaciones concluyentes con índices de filiación aceptables. Si adicionalmente se logra la estandarización de la prueba trabajando con cantidades reducidas de sus reactivos, esto representaría un beneficio económico, por lo que la FAFG contaría con más recursos para las identificaciones. Con lo que respecta a las víctimas de desaparición forzada, esta prueba podría traer cierre a algunos de los casos pendientes.

¹ El uso de nombres comerciales no implica endoso o recomendación alguna por parte de la autora del presente trabajo ni las instituciones involucradas

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

Estandarizar y validar la metodología para la amplificación de marcadores STRs humanos en muestras de tejidos usados como evidencia (esqueléticas, sangre, semen y cabello) y muestras utilizadas como referencias (sangre e hisopado bucal por la Fundación de Antropología Forense de Guatemala, utilizando el kit *Investigator Argus-X12*.

B. Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones óptimas de amplificación e inyección para el kit *Investigator Argus-X12* que permitan obtener los resultados esperados en muestras de evidencia.
- Establecer las condiciones óptimas de amplificación e inyección para el kit *Investigator Argus-X12* que permitan obtener los resultados esperados en muestras referenciales, utilizando un cuarto de la reacción del kit.
- Determinar el umbral de detección de la concentración de ADN para el kit *Investigator Argus-X12* en muestras referenciales y de evidencia.
- Validar la repetitividad y reproducibilidad de los resultados obtenidos al utilizar el kit *Investigator Argus-X12* en muestras de referenciales y de evidencia.
- Establecer los parámetros de análisis para la correcta interpretación de los perfiles genéticos obtenidos de muestras referenciales y de evidencia.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Situación forense actual en Guatemala

1. Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG). La FAFG es una organización no gubernamental y sin fines de lucro que realiza investigación en casos de muerte no esclarecidos con el fin de aportar evidencia al sistema de justicia (FAFG, 2014). Para ello cuenta con un departamento de investigaciones, un departamento de antropología y un laboratorio de Genética Forense. El laboratorio de genética forense surgió en el año 2008 y obtuvo la acreditación ISO 17025:2005 en el año 2010. Está especializado en el análisis genético de muestras de osamentas y son capaces de analizar todo tipo de muestras de ADN (FAFG, 2014). Entre los casos que investiga, se trabaja con casos de desapariciones forzadas durante el conflicto armado interno de Guatemala. Para ello se cuenta con las muestras de osamentas recolectadas en fosas comunes identificadas correspondientes a esta época.

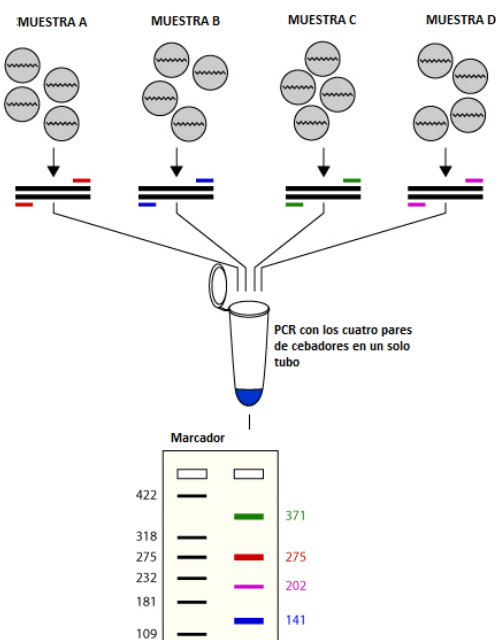
B. Pruebas genéticas en estudios forenses

En las ciencias forenses el estudio de muestras por medio del análisis de ADN ha adquirido mucha importancia principalmente en el aspecto legal (Butler, 2012). Esto se debe a la naturaleza de las muestras forenses en las que debido a las condiciones en las que se encuentran dichas muestras únicamente una tipificación del ADN permite identificar el individuo donante de dicha muestra (Butler, 2005). Estas pruebas genéticas permiten entonces la formación de bases de datos las cuales pueden ser utilizadas para resolver crímenes antes considerados como inconclusos (Butler, 2012). En la actualidad las pruebas genéticas más utilizadas son aquellas realizadas por medio del análisis de STRs (por sus siglas en inglés, Short Tandem Repeats) autosómicos y sexuales además del análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) (Hill, 2008).

1. Análisis de PCR para la obtención de perfiles genéticos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la multiplicación de copias de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una simple hebra. Esta técnica permite la tipificación de regiones polimórficas cortas de ADN (Kloosterman *et al.*, 1993). En ciencias forenses se comenzó a trabajar con la amplificación de marcadores STRs utilizando PCR a principios de la década de los 90 (Butler, 2006). Trabajar con marcadores STRs permite que se pueda realizar un PCR multiplex en el cual se amplifican múltiples *loci* simultáneamente (Edwards y Gibbs, 1994).

A diferencia de un PCR convencional, en un PCR multiplex se agregan iniciadores para múltiples regiones de ADN en una sola reacción (Elnifro *et al.*, 2000). En la Figura 1 se muestra una representación gráfica de las ventajas que tiene el uso del PCR multiplex en donde se puede utilizar marcadores para cuatro distintas muestras en una única reacción de amplificación (PREMIER Biosoft, s.f.) Entre las ventajas que tiene el uso de PCR multiplex se encuentra que permite la amplificación de una gran cantidad de regiones polimórficas que son utilizadas para la elaboración de perfiles genéticos ya que proveen de un alto poder de discriminación (Edwards y Gibbs, 1994).

Figura 1. Representación gráfica de una reacción PCR multiplex



(Adaptado de PREMIER Biosoft, s.f.)

2. Análisis de cromosomas autosómicos. En las ciencias forenses se ha escogido un grupo de marcadores STR que cumplen con las características para ser utilizados en identificaciones humanas. Entre estas características se encuentra el que sean polimórficos en la población y que no estén relacionados con posibles enfermedades genéticas (Butler, 2006). Las principales regiones que se utilizan se encuentran dentro de los 22 cromosomas autosómicos, o sea, exceptuando los cromosomas sexuales X y Y. Estas regiones además de permitir establecer relaciones genealógicas permiten la determinación de líneas étnicas ancestrales (Hill, 2008). En un organismo diploide, se encuentran dos alelos por locus en los diferentes cromosomas homólogos, una región que posee dos alelos idénticos es considerada un homocigoto mientras que uno con alelos diferentes es un heterocigoto. Cada par de cromosomas homólogos están compuestos por un cromosoma materno y uno paterno ya que durante la meiosis el par de cromosomas se segrega independientemente en los gametos (Pierce, 2009).

En 1997 el FBI² estableció 13 regiones STR que serían utilizadas para la creación de bases de datos utilizables en el sistema judicial. Las 13 regiones utilizadas por el CODIS (Combined DNA Index System) son: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, y D21S11 (Butler, 2007). El grado de polimorfismo que tiene la combinación de estas regiones STR permite la discriminación entre el ADN de una persona y otra de forma que la probabilidad de que dos personas compartan el mismo perfil de 13 loci utilizados en CODIS es de uno en un mil millones o más (Ashcroft *et al*, 2002). En 2015 el laboratorio del FBI anunció que se extendería la selección original de STR utilizadas en el NDIS (Sistema de Índice Nacional de ADN, por sus siglas en inglés). Se agregaron siete loci STR y la fase de implementación se espera que concluya en enero 2017. Las 20 regiones por lo tanto serían los 13 mencionados con anterioridad, más: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 y D22S1045 (FBI, 2015).

² FBI = Federal Bureau of Investigation (Oficina Federal de Investigación de EEUU)

3. **Análisis de ADN mitocondrial.** El análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) en las ciencias forenses es un área en crecimiento. A pesar de que este tipo de análisis es menos discriminativo que el de ADN autosómico, el uso de ADNmt permite la investigación de muestras biológicas limitadas (Melton y Nelson, 2001). A partir de una tipificación de ADNmt se puede realizar la comparación entre la muestra de un individuo y una evidencia y se puede excluir o incluir al sujeto como un posible sospechoso (Holland y Parsons, 1999). Este tipo de pruebas es muy utilizado en casos no resueltos debido a que en las evidencias el ADN nuclear puede encontrarse en cantidad insuficiente o degradado mientras que el ADNmt se encuentra en mayores cantidades (Melton, 2009).

Las principales ventajas del uso de ADNmt en ciencia forense se debe a que existe un alto número de copias del ADN en cada mitocondria y miles de mitocondrias en cada célula (Pereira *et al*, 2010). Esto es una ventaja en los casos forenses debido a que las probabilidades de encontrar este tipo de ADN no degradado aumentan en comparación con las del ADN nuclear (Pereira *et al*, 2010). Como una característica adicional cabe mencionar que el ADN mitocondrial se hereda únicamente por línea materna lo que permite un análisis de ADN más específico (GenaGen, 2014).

4. **Análisis del cromosoma Y.** El cromosoma Y es el cromosoma humano más pequeño el cual realiza un intercambio genético con el cromosoma X en las regiones pseudoautosómicas (PAR) (Gusmao y Carracedo, 2003). El análisis de los STR-Y se ha convertido en una herramienta útil en los casos forenses. Las ventajas de estos análisis se deben a que se puede trazar una línea directa de paternidad debido a que los hijos heredan el cromosoma Y únicamente de su padre (Sykes e Irven, 2000). Por otra parte se ha demostrado que este análisis permite la identificación del ADN de violadores a partir de muestras de mezclas en hisopados vaginales (Honda *et al*, 1999).

5. Análisis del cromosoma X. El cromosoma X posee características que lo diferencian de otros cromosomas. En primer lugar tiene un patrón de herencia en el que los hombres poseen únicamente un cromosoma X mientras que las mujeres poseen dos, uno heredado del padre y uno de la madre (Szibor, 2007). Se ha demostrado que el análisis de STRs-X es útil para la resolución de casos deficientes (Barbaro *et al*, 2006). Se define como un caso deficiente aquel en el que no se cuenta con los familiares directos, principalmente el padre en casos de paternidad (Szibor, 2007). En este tipo de casos el análisis del cromosoma X permite la construcción del perfil del posible padre a partir de individuos femeninos con los cuales comparte dicho cromosoma (Barbaro *et al*, 2006).

El desarrollo de los marcadores para el cromosoma X surgió principalmente para pruebas de paternidad y otros casos complejos de filiaciones familiares. Este análisis permite una exclusión definitiva de la paternidad en dos hermanas sin contar con el ADN de los padres debido a que ambas debieran compartir el ADN del cromosoma X del supuesto padre (Szibor, 2007). En los casos en los que no se cuenta con el ADN del padre en cuestión el poder de exclusión por medio de STRs autosómicos disminuye considerablemente por lo que contar con herramientas como el análisis del cromosoma X permite ampliar las probabilidades de exclusión entre las muestras (Edelmann *et al*, 2004).

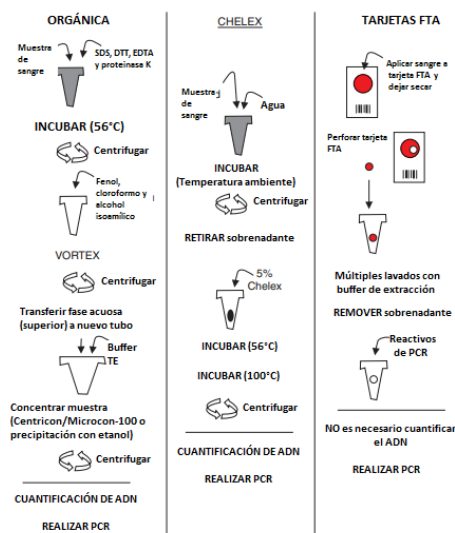
C. Extracción de ADN

La etapa preliminar para la realización de pruebas de ADN es la extracción del mismo a partir de muestras biológicas. El objetivo de esta técnica consiste en la separación del ADN de componentes celulares proteicos que tienen como función precisamente la protección del ADN del medio (Butler, 2006). Luego de la obtención del ADN y su respectiva purificación ya es posible llevar a cabo pruebas genéticas con marcadores STR por lo que es un paso vital en la obtención de perfiles genéticos (Butler, 2011).

1. Métodos utilizados para la extracción. El método de extracción de ADN consiste en la separación de las proteínas y componentes proteicos presentes en la célula para dejar únicamente las moléculas de ADN (Butler, 2005). Existen tres técnicas principales para la extracción de ADN: extracción orgánica, extracción Chelex y extracción por tarjetas FTA (Butler, 2005). Entre otras técnicas de extracción se encuentra: la diferencial (modificación de la extracción orgánica que separa células epiteliales de las células espermatozógenas), la captura directa de células espermatozógenas y la extracción de fase sólida (Butler, 2005).

La extracción orgánica consiste en una extracción con fenol/cloroformo y que fue utilizada por mucho tiempo, la extracción por Chelex es una versión más rápida de la extracción orgánica en la que se obtiene ADN de simple hebra y por última la extracción por tarjetas de FTA es una de las más eficientes y permite el almacenamiento de las muestras por más tiempo. Por otra parte la extracción de fase sólida se basa en la afinidad de los ácidos nucleicos a la sílica gel (Butler, 2005). En la Figura 2 se muestran las principales diferencias entre tres de las técnicas mencionadas previamente para la extracción de ADN. Se puede observar que la técnica de FTA es la más eficiente ya que implica únicamente lavados de una muestra de la tarjeta FTA para llevar a cabo el PCR (Butler, 2005).

Figura 2. Comparación de las técnicas de extracción de ADN por soluciones orgánicas, Chelex y tarjetas FTA



(Modificado de Butler, 2005).

2. Dificultades de la extracción en muestras forenses. Las muestras forenses presentan dificultades al realizar la extracción y las técnicas posteriores de PCR. Esto se debe a que las muestras se han sometido a ambientes adversos para su conservación por lo que se encuentran degradadas, además de contener inhibidores que impiden tanto la extracción como la amplificación del ADN y por esta razón en algunos casos no es posible la extracción de ADN (Köchl *et al*, 2005). Debido a dichas complicaciones los métodos de extracción utilizados en muestras forenses deben de considerar que el ADN podría ser menos soluble en agua y que debe evitarse métodos agresivos para la extracción ya que no se puede perder la cantidad de ADN disponible (Rohland y Hofreiter, 2007).

D. Análisis molecular de muestras forenses

Existen principalmente tres tipos de análisis moleculares para la identificación de muestras forenses humanas: SNPs (single nucleotide polymorphism), STRs (short tandem repeats) y la secuenciación de regiones de ADNmt (Tillmar, 2010). La más utilizada es la de los marcadores STR debido a su alto grado de variabilidad y la posibilidad de amplificación por medio de PCR multiplex (Butler, 2006).

1. Uso de los marcadores STR para identificación humana. Los marcadores STR son secuencias simples de ADN que incluye la repetición de entre dos y siete pares de bases (Butler, 2007). Dentro del genoma humano existe una amplia abundancia de marcadores STR polimórficos, sin embargo se han estudiado STR que no sean codificantes para que sean únicamente utilizadas como un parámetro para análisis de identificación genética, además si están en regiones codificantes estos STRs estarían sujetos a presión de selección (Chakraborty *et al*, 1999). Los marcadores STR que fueron seleccionados para la formación del CODIS se encuentran en cromosomas distintos con la excepción de TPOX y D2S1338 (cromosoma 2) y D5S818 y CSF1PO (cromosoma 5) ya que al estar separados la segregación que se da es independiente durante la meiosis y por lo tanto se puede llevar a cabo un estimado estadístico de coincidencia aleatoria de ADN (Butler, 2006).

2. Variaciones de los marcadores STR en la población. El objetivo de utilizar STRs como herramientas de identificación está ligado con su característica polimórfica. Esto se debe a que existe una gran variabilidad genética dentro y entre las poblaciones con respecto a estas regiones lo que permite la obtención de perfiles únicos para cada persona (Butler, 2007). A pesar de que cada STR posee un poder de discriminación relativamente bajo la combinación de múltiples regiones permite la obtención de un alto poder de discriminación entre los individuos (Chakraborty *et al*, 1999). Entre las variaciones que se pueden encontrar entre las regiones de los STR a parte del número de repeticiones son las inserciones y deleciones en la secuencia que se repite la cual puede modificar la cantidad de bases que se repiten en algunas secciones del tándem (Butler, 2006).

3. Potencial de relación entre STR y enfermedades. La Bioética forma una parte muy importante dentro de las ciencias forenses principalmente en la tipificación de perfiles de ADN (Butler, 2014). Esto se debe a que la tecnología permite actualmente la obtención de toda la información genética de un individuo incluyendo la relación de esta con posibles enfermedades. Surge entonces la inquietud en la comunidad científica en el uso de marcadores STR para la tipificación del ADN y la posible invasión a la privacidad de un individuo sobre el conocimiento de sus probabilidades de manifestar una enfermedad. Estas inquietudes han sido fundamentadas con el hecho de que los STR pueden ser utilizados tanto para la investigación de regiones relacionadas con enfermedades como para la identificación en investigación forense (Cho y Sankar, 2004). Sin embargo instituciones como el FBI se han asegurado que las regiones que utilizan para la identificación en ciencias forenses estén desligadas de hallazgos médicos (Butler, 2006).

El único caso que se demostró que tenía implicaciones éticas y que por lo tanto dejó de utilizarse como locus STR para la identificación humana es el del locus HumARA (Butler, 2006). Este locus se encuentra en el cromosoma sexual X y era utilizado originalmente como un STR para identificación (Butler, 2006). Sin embargo se descubrió que este STR y sus polimorfismos

podían estar asociados a la susceptibilidad de padecer arterioesclerosis (Qiangsun *et al*, 2001). Por esta razón este STR ya no es considerado para identificaciones humanas. De esta manera se puede garantizar que con los conocimientos que se tienen a la fecha los marcadores STR utilizados para la identificación no están ligados con la susceptibilidad a enfermedades (Butler, 2006).

E. Electroferogramas

El análisis de los resultados de la amplificación de STRs puede realizarse por medio de la separación de los amplicones STR obtenidos del PCR para la determinación del número de repeticiones de dicho tándem en cada alelo (Butler, 2007). Dicha medición se lleva a cabo a partir de una separación por tamaño de los amplicones en un gel o por electroforesis capilar (Butler, 2007). La más utilizada en ciencias forenses es la electroforesis capilar debido a su automatización y eficiencia (Albarghouthi y Barron, 2000).

1. Fundamentos de la electroforesis capilar. La electroforesis capilar es un método de separación de los componentes de una mezcla, en el cual se utiliza un campo eléctrico dentro de un tubo capilar (Petersen y Mohammad, 2001). Este método es una alternativa a la separación por medio de electroforesis en gel que permite una metodología más automatizada (Albarghouthi y Barron, 2000). El principio básico de esta técnica consiste en aplicar el campo eléctrico al ADN con carga negativa provocando que este se movilice hacia el electrodo positivo (Applied Biosystems, 2009). Los capilares tienen un diámetro de entre 25 y 100 μm y están cubiertos internamente de sílica gel (Albarghouthi y Barron, 2000). La amplificación de los loci STR permiten la obtención de productos del PCR con marcadores fluorescentes los cuales pueden ser separados por medio de electroforesis capilar y ser detectados por un analizador genético que en base a las señales de luminiscencia, con lo cual se establecerá el tamaño y por lo tanto el número de repeticiones en cada región (Sherif y Ahmed, 2012).

2. Interpretación de electroferogramas. Un electroferograma es una representación gráfica del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por medio de un PCR relacionado con las URF (Unidades Relativas de Fluorescencia) que emite cada uno de los marcadores de dichos fragmentos (Cuadros *et al*, 2008). De acuerdo a la Base de Datos de ADN de Manejo de Científicos Forenses y líderes técnicos de ADN de Estados Unidos (2013) los factores que deben observarse en un electroferograma son: las alturas de los picos, la presencia de alelos, alelos no amplificados, mínimo de URF (Unidades Relativas de Fluorescencia), artefactos (productos del PCR no alélicos), inhibiciones, microvariantes, alelos fuera de la escalera, perfiles, entre otros (DNA Database Forensic Scientist Manager and DNA Technical Leader, 2013).

F. Kits utilizados en genética forense

Existen kits comerciales, utilizados alrededor del mundo que permiten la utilización de marcadores STR con control de calidad de una manera efectiva. Estos kits contienen escaleras moleculares, controles positivos y los iniciadores marcados con fluorescencia para la obtención de regiones del ADN luego de la amplificación por PCR (Butler, 2012). Estos kits permiten además la amplificación simultánea de múltiples regiones utilizadas de manera estándar en Estados Unidos y Europa (Butler, 2012).

1. Kits para cromosomas autosómicos. Para la amplificación de STRs en cromosomas autosómicos existen principalmente tres casas comerciales que producen estos kits: Promega®, Applied Biosystems® y Qiagen®³. Dentro de los kits se encuentran Identifiler y PowerPlex que contienen los 13 marcadores STR del CODIS y se diferencian por otros marcadores como el D2S1338 y el D19S433 presentes en Identifiler y el Penta D y Penta E presentes en PowerPlex (Butler, 2012).

³ El uso de nombres comerciales no implica endoso por parte del autor.

La comunidad científica busca estandarizar de manera universal las regiones utilizadas en investigaciones forenses por lo tanto surgió la producción de un nuevo kit denominado GlobalFiler. Este kit amplifica 21 loci STR autosómicos entre los que se encuentran los 13 del CODIS y 7 adicionales que son considerados en Europa por el Set Estándar de loci Europeo (ESSL). Permite además la amplificación de una región polimórfica de inserción/delección del cromosoma Y, un STR-Y y la región de la amelogenina para la determinación del sexo (Applied Biosystems, 2014).

2. Kits mitocondriales. Para el análisis de ADNmt se realiza una amplificación de regiones más grandes que los STR por lo que la técnica que se utiliza para el análisis de ADNmt es la secuenciación (Melton y Nelson, 2011). Uno de los kits utilizados para la secuenciación de estas regiones del ADNmt es el BigDye Terminator v 3.0 de Applied Biosystems. Este kit utiliza dGTP para la amplificación de regiones mitocondriales en muestras difíciles. Debido a que no es posible encontrar STRs en el ADNmt, este kit por lo tanto debe buscar la secuenciación de regiones más largas de ADN.(Applied Biosystems, 2010). Debido a la degradación de las muestras, el ADN nuclear no se encuentra disponible para su análisis por lo que es necesario el uso de ADNmt que cuenta con múltiples copias en cada célula (Pereira *et al*, 2010).

3. Kits de cromosomas sexuales. Existen kits para la amplificación de STRs tanto para el cromosoma Y como para el cromosoma X. Los kits para el cromosoma Y se desarrollaron inicialmente y años después se llevó a cabo la producción de kits para la amplificación de regiones del cromosoma X (Szibor, 2007). Para el cromosoma Y los kits más utilizados son los de Y-Plex y Y-filer. El primero permite la amplificación de 6 o 12 regiones del cromosoma Y más la región de la amelogenina y el segundo permite la amplificación de 16 regiones del cromosoma Y (Shewale *et al*, 2004).

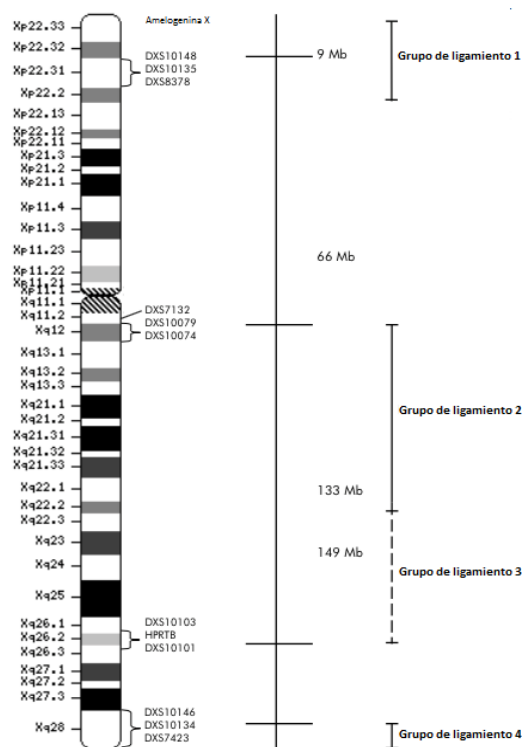
Para el cromosoma X actualmente existen 4 kits para su amplificación. Entre estos kits se encuentran los Mentype Argus X-UL y X-8 los cuales amplifican cuatro y ocho regiones respectivamente del cromosoma X más la región de la amelogenina (Szibor *et al*, sf). Por otra

parte se encuentra el X-Decaplex el cual se desarrolló en España y Portugal y que amplifica 10 regiones STR (Szibor *et al*, sf). Por último se encuentra el kit Investigator Argus X-12 el cual fue desarrollado en 2010 y que amplifica 12 regiones STR más la región de la amelogenina (Szibor *et al*, sf).

G. Investigator Argus X-12

1. Descripción general del kit. Investigator Argus X-12 es un kit comercial que permite la amplificación *multiplex* de 12 loci STR del cromosoma X además de la región de la amelogenina. Este kit contiene 4 grupos de acoplamiento y posee 3 marcadores por grupo. Por lo tanto los iniciadores que proporciona el kit corresponden a la Amelogenina (determinante del sexo), DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10135, DXS10146, DXS10148 y HPRTB (Qiagen, 2013). En la Figura 3 se muestra una representación gráfica de la distribución de dichas regiones y grupos dentro del cromosoma X.

Figura 3. Ideograma de la distribución de las regiones de amplificación en el cromosoma X



(Modificado de Qiagen, 2013).

2. Equipo y reactivos necesarios para el uso del kit. De acuerdo a los desarrolladores del kit es necesario contar con la matriz estándar de los fluoróforos BT5 con la cual se establece la interacción entre las emisiones de luz de cada fluoróforo en el analizador genético. Además se debe contar con un analizador genético que permita la obtención de los datos de luminiscencia de las muestras y un software el cual interprete dichos datos, como GeneMapper ID ® versión 3.2.1., para la obtención de los electroferogramas (Butler, 2005).

H. Validación de métodos

1. Definición general. De acuerdo a la norma ISO 9000:2000 una validación es aquel proceso por medio del cual se puede confirmar, en base a evidencia objetiva, que se cumplen todos los requisitos para su uso específico. En el caso de mediciones analíticas en la validación se establece el desempeño y limitaciones de un método (Lazos y Hernández, 2004). Posterior a la validación de desarrollo de un kit cada laboratorio debe realizar una validación interna. Este proceso es una parte esencial para garantizar la calidad de un laboratorio, su robustez, confiabilidad y reproducibilidad (Butler, 2006).

2. Guías de validación de acuerdo al *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*. SWGDAM es un grupo de 50 científicos de Estados Unidos y Canadá que representan laboratorios forenses locales, estatales y federales. Este grupo realizó una guía en la cual establecen puntos para la validación de métodos de análisis de ADN. De acuerdo a ellos una validación interna debe llevar: un análisis de muestras no probativas, estudios de sensibilidad y efectos estocásticos, pruebas de precisión y exactitud, estudio de mezclas y una valoración de contaminación (SWGDAM, 2012).

Las pruebas de muestras no probativas se utilizan para comparar resultados previos para asegurar concordancia de los resultados. Las pruebas de sensibilidad evalúan los efectos de una baja cantidad o calidad de las muestras además de definir límites del ensayo. En cuanto a la

precisión y exactitud se llevan a cabo pruebas de repetitividad (concordancia de resultados en el mismo instrumento y con el mismo operador) y reproducibilidad (concordancia de resultados entre diferentes operadores y diferentes instrumentos) (SWGDM, 2012).

En las pruebas de muestras se busca evaluar los parámetros de interpretación de muestras, definir las características de los perfiles del contribuyente mayoritario y minoritario, proporción de alturas según el contribuyente y para establecer bases para reconocer ya sea mezclas o contaminación en el análisis. Por último, la valoración de contaminación evalúa controles para la detección de ADN exógeno proveniente ya sea de reactivos, consumibles, superficies o del operador (SWGDM, 2012).

V. MARCO METODOLÓGICO

La validación del kit *Investigator Argus X-12* consistió de una fase preliminar y una fase final de validación. Para ello se utilizó como base los lineamientos del Grupo Científico de Trabajo para Métodos de Análisis de ADN o *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGAM) de Estados Unidos (2012) para la validación de métodos de análisis de ADN. Para la extracción de ADN (muestras de osamentas y muestras de evidencia), cuantificación de ADN y análisis genético se utilizó protocolos validados previamente por el Laboratorio de Genética Forense de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala⁴. Para las muestras de referencia la extracción de ADN se realizó por medio del método de extracción para muestras fijadas en tarjetas FTA y extracción por Chelex, también validados previamente por el laboratorio.

Las muestras óseas se extrajeron utilizando el kit *QIAamp DNA Blood Maxi* (QIAGEN), de acuerdo a los protocolos utilizados en la FAFG. Para la cuantificación se utilizó el kit *Quantifiler* (*Applied Biosystems*) en PCR de tiempo real utilizando un termociclador *Applied Biosystems 7500*, también de acuerdo a los protocolos utilizados en la FAFG. El laboratorio de Genética de la FAFG cuenta con tres termocicladores 9700 y 2 termocicladores Veriti, además de dos analizadores genéticos *Applied Biosystems*: un 3130 y un 3130xl. El 3130 es un analizador genético de electroforesis capilar con 4 capilares y acepta placas de 96 pozos. Por otra parte, el 3130xl cuenta con 16 capilares y soporta en la misma corrida dos placas de 96 pozos.

Debido a que la óptica y sensibilidad de estos equipos es distinta es importante que la validación se lleve a cabo en ambos equipos.

⁴ Protocolos internos.

A. Fase preliminar

En la fase preliminar se trabajó con, ocho muestras de hisopado bucal en tarjetas FTA, tres muestras de sangre en tarjetas FTA, una muestra de goma de mascar, una muestra de sangre (evidencia) y una muestra de semen. Todas las muestras utilizadas fueron colectadas previamente por la FAFG y se utilizaron desligadas de identificadores personales. Las muestras de evidencia se cuantificaron utilizando el kit Quantifiler (Applied Biosystems). Cada muestra se amplificó en duplicado y con cada grupo de muestras se utilizó un control negativo (la misma mezcla de reacción pero no se agregó una muestra de ADN) para determinar el número de ciclos y la cantidad de mezcla de reacción que se debía utilizar (reacción completa o $\frac{1}{4}$ de reacción). Las muestras, exceptuando las de FTA, se diluyeron dependiendo del resultado de cuantificación para tener un máximo de entre 0.1 y 0.5 nanogramos de ADN total en la mezcla de reacción. Los termocicladores utilizados para la amplificación de ADN fueron Applied Biosystems 9700.

La amplificación utilizando el kit *Investigator Argus X-12* se realizó con una PCR con número de ciclos distintos dependiendo del tipo de muestra. En el Cuadro 1 se presentan las condiciones de esta reacción para muestras con alto y bajo número de copias, sugeridas por el fabricante. Las muestras de evidencia y de osamentas se amplificaron utilizando el programa para bajo y alto número de copias, y las muestras de referencia utilizando el método de alto número de copias. Con base en los resultados obtenidos en esta fase se decidió evaluar, para las muestras de referencias, 24 y 23 ciclos en la tercera fase del programa. El volumen de reacción utilizado fue de 25 μL de los cuales 5 μL fueron de la mezcla de reacción, 2.5 μL de mezcla de iniciadores, 0.6 μL de polimerasa, 10 μL de muestra y 6.9 μL de agua libre de nucleasas (para muestras en tarjetas FTA se agregó 16.9 μL de agua). Para las muestras de referencia se trabajó adicionalmente con cuartos de reacción por lo que los volúmenes en este caso fueron: 1.25 μL de mezcla de reacción, 0.63 μL de mezcla de iniciadores, 0.15 μL de polimerasa y 4.23 μL de agua libre de nucleasas.

Con dichas muestras se analizaron las condiciones de inyección en el analizador genético: 2kV / 5 s, 3 kV / 5 s, 3kV / 7 s, 3Kv / 10 S, 3 kV / 11s, 3kV / 15 s y 3kV / 22s. El analizador genético utilizado fue un Applied Biosystems 3130 y un Applied Biosystems 3130xl. Con base en los parámetros de repetitividad, presencia de artefactos y obtención de perfil de las condiciones analizadas, se seleccionaron las condiciones de inyección y de mezcla de reacción óptimas para la obtención de perfiles.

Cuadro 1. Condiciones de PCR de acuerdo al número de copias

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos (alto número de copias >100 pg/25 µl)	Número de ciclos (bajo número de copias <100 pg/25 µl)
94	4 minutos	-	-
96	30 s	5	5
63	120 s		
72	75 s		
94	30 s	25	27
60	120 s		
72	75 s		
68	60 min	-	-
10	Hasta almacenamiento	-	-

B. Fase de validación

Para la fase de validación de muestras conocidas se trabajó con 12 muestras: 2 de hisopado bucal en tarjetas FTA, 2 muestras esqueléticas, 2 muestras dentales, 2 muestras de sangre en FTA, 2 extractos por el método de Chelex®, 4 de evidencia (semen, sangre, goma de mascar y extracto de estándar DNA9947a) y controles negativos para cada tipo de extracción. La validez del método, se basó en los lineamientos de validación para métodos de análisis de ADN de la SWGDAM en Estados Unidos (2012), que indican que una metodología es validada al realizar los siguientes estudios y comprobar sus resultados: Evaluación de resultados de muestras conocidas, pruebas de sensibilidad, repetitividad, reproducibilidad, estudios de efectos

estocásticos, mezclas de ADN y evaluación de la contaminación; los cuales demuestran que un procedimiento se comporta de la manera esperada.

Las pruebas de sensibilidad consistieron de tres fases: cuantificación de ADN, amplificación de diluciones seriadas y los análisis de rango dinámico, rango de objetivo ideal, umbral de detección, umbral de cuantificación, balance de heterocigotos, umbral estocástico y proporción de *stutters* (bandas sombra de un alelo, también denominado tartamudeo). Se trabajó en la primera fase la cuantificación de ADN en los extractos de las muestras de evidencia, muestras esqueléticas y extractos de ADN por el método de Chelex®, los cuales se trabajaron posteriormente a 100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25 pg/uL. Para la segunda fase se utilizó, para las muestras de hisopado bucal en FTA, la tarjeta FTA original y un hisopo con muestra fresca (del mismo donante) sumergido en 1.5 mL de buffer TE. Utilizando esta dilución inicial en TE prepararon diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64, las cuales se colocaron en tarjetas FTA para su posterior extracción. Para las muestras de sangre en FTA se trabajó con las mismas diluciones que en las muestras de hisopado bucal. Se trabajó con muestras femeninas y masculinas para cada uno de los tipos de muestras. Estas pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo en el analizador genético 3130xl.

Para comprobar la repetitividad se trabajó con 10 muestras de las utilizadas anteriormente (2 por cada método de extracción: Hisopado bucal fijado en tarjeta FTA, sangre fijada en tarjeta FTA, extracto de Chelex®, evidencia y muestras esqueléticas). Estas muestras se trabajaron en triplicado. Por otra parte la reproducibilidad se trabajó con las mismas muestras en tres termocicladores distintos Applied Biosystems 9700. Se planeaba trabajar en utilizando dos analizadores genéticos distintos: Analizador genético *Applied Biosystems* 3130 y el Analizador genético *Applied Biosystems* 3130xl, sin embargo el analizador 3130 se encontró durante la realización de esta investigación, fuera de servicio por lo que las pruebas se realizaron únicamente para el 3130xl. Las mezclas de ADN se trabajaron con extractos por Chelex® de

muestras de saliva (una femenina y una masculina) en proporciones de 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 y 1:9 con un control negativo (amplificación sin muestra de ADN).

Por último se llevó a cabo una optimización para la cantidad de estándar de tamaño (BTO) necesario para la electroforesis capilar. Para ello se hizo análisis utilizando como umbral de cuantificación 20 URF. Se probó con cantidades de BTO de 0.1 μ L, 0.25 μ L y 0.5 μ L siendo el último el recomendado en el kit. Para estas pruebas se utilizó como muestras escaleras alélicas y muestras de referencia con perfil conocido.

Todos los perfiles genéticos obtenidos en los analizadores genéticos fueron analizados utilizando el programa GeneMapper ID [®] versión 3.2.1, de acuerdo a protocolos internos de la FAFG.

C. Análisis de datos

En la fase preliminar se buscaba evaluar el porcentaje de perfiles completos obtenidos del total de las muestras además de determinar la altura de los picos y el porcentaje de los picos que representan artefactos. Este análisis se realizó para cada ciclaje, condición de inyección y cantidad de mezcla de reacción utilizadas.

En la fase de validación, para la prueba de sensibilidad se buscaba determinar el rango dinámico, rango de objetivo ideal y balance de heterocigotos. El rango dinámico se determinó en base a los límites superiores, en donde no más del 10% de los loci presentaron picos fuera de escala (mayores a 7000 URF) en las condiciones más altas de inyección, e inferiores (en donde no más del 10% de los loci presentaron *dropouts* [pérdida de alelos]) en las condiciones más bajas de inyección. Por otra parte el rango de objetivo ideal se estableció en la concentración donde menos del 10% del total de alelos representara picos fuera de escala, *dropouts*, efectos estocásticos y otros artefactos (*pull-ups*, picos de adenilación incompleta, *stutter*, y picos fuera

de escalera). Se esperaba que este coincidiera con la concentración sugerida por el kit (20 pg/uL - 50 pg/uL).

El balance de heterocigotos se definió por el cálculo de la altura promedio de picos en los loci heterocigotos que no presenten efectos estocásticos. Los resultados de todas las diluciones se graficaron y se debía observar que a mayor concentración aumentaba el balance entre picos heterocigotos y se encontrarían arriba del 60% de desequilibrio recomendado. El porcentaje de desequilibrio recomendado se calculó para cada condición de inyección delimitando dos grupos de concentraciones que se comportaran de forma similar en términos de efectos estocásticos y pérdida de alelos. En cada grupo se determinaron los límites aceptables de porcentaje de desequilibrio en base al promedio de desequilibrio entre los loci heterocigotos dentro del rango del grupo.

Dentro de las pruebas de sensibilidad también se determinaron los límites de detección, cuantificación y el umbral estocástico. Para el umbral de detección y cuantificación se utilizaron los controles negativos (sin ADN) y blancos de reactivos (sin ADN, trabajado desde la extracción) para cada condición de inyección. Para cada muestra se analizaron 50 picos por loci y se calculó la altura promedio de estos (línea base) y la desviación estándar. El umbral de detección corresponde al promedio más tres desviaciones estándar y el umbral de cuantificación se calculó utilizando el promedio más 10 desviaciones estándar sobre la línea base. Por otra parte el umbral estocástico se determinó para cada condición de inyección utilizando los loci heterocigotos en donde uno de los alelos hermanos falta debido a un *dropout* (efecto estocástico). Para el alelo que sí fue llamado se calculó la altura promedio, desviación estándar y valor máximo. El límite se determinó como tres veces la desviación estándar más la altura promedio y ninguno de los valores máximos debía sobre pasar este límite. Por último el porcentaje de altura de tartamudeo se calculó dividiendo el pico producto del tartamudeo dentro del pico real.

Para la determinación de la repetitividad se buscaba concordancia entre los perfiles obtenidos del mismo individuo obtenido en triplicado mientras que para la reproducibilidad se buscaba concordancia entre los perfiles obtenidos, en triplicado, utilizando distintos termocicladores. Se realizó de igual forma un análisis de mezclas en el que se demostrara qué porcentaje del perfil del contribuyente minoritario en la mezcla era amplificado y se realizó una valoración de la contaminación a partir de las amplificaciones observadas en los controles negativos, en las mismas condiciones de inyección y reacción utilizadas en todas las muestras. Por último se analizó la cantidad de estándar de tamaño (BTO) que podía ser utilizado a diferentes condiciones de inyección y la precisión de la escalera alélica. Debido a la naturaleza cualitativa de los perfiles genéticos obtenidos como resultados, no es posible realizar un método estadístico para el análisis de los mismos. La eficiencia del método se verá reflejada en la obtención del perfil genético esperado.

D. Consideraciones éticas

Las muestras utilizadas para la validación fueron colectadas previamente para actividades de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala. Para éstas se cuenta con un consentimiento informado en donde los sujetos accedieron que sus muestras fueran utilizadas posteriormente. En el anexo 1 se adjunta una copia del formato de consentimiento firmado por los participantes. Las muestras que se utilizarán no fueron recolectadas por la autora mediante intervención del sujeto, sino que fueron recolectadas previamente. Además, la autora de este trabajo tuvo acceso a los identificadores personales de estas muestras, las cuales han sido codificadas previamente por la FAFG. La autora no tuvo acceso a las bases de datos que relacionan estos códigos con la información privada identificable de los sujetos de los cuales se obtuvieron las muestras. Además, esta actividad no es investigación ya que su objetivo no es generar conocimiento, sino únicamente estandarizar una metodología que permitirá mejorar el análisis de muestras forenses que realiza la FAFG en particular. Adicionalmente, en el anexo 2 se adjunta la carta de aprobación de parte del Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala para llevar a cabo este proyecto.

VI. RESULTADOS

A. Fase preliminar

Se realizó una comparación de los alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos presentes en la amplificación de muestras referenciales para los programas de PCR con 25 ciclos (Figura 4), 24 ciclos (Figura 5) y 23 ciclos (Figura 6) para determinar las mejores condiciones de amplificación. Los alelos esperados se determinaron en la primera prueba a partir de duplicados y pruebas iniciales. Para las siguientes pruebas se utilizaron los primeros perfiles obtenidos como referencia.

Figura 4: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 25 ciclos con reacción completa, en los analizadores genéticos 3130 y 3130xl.

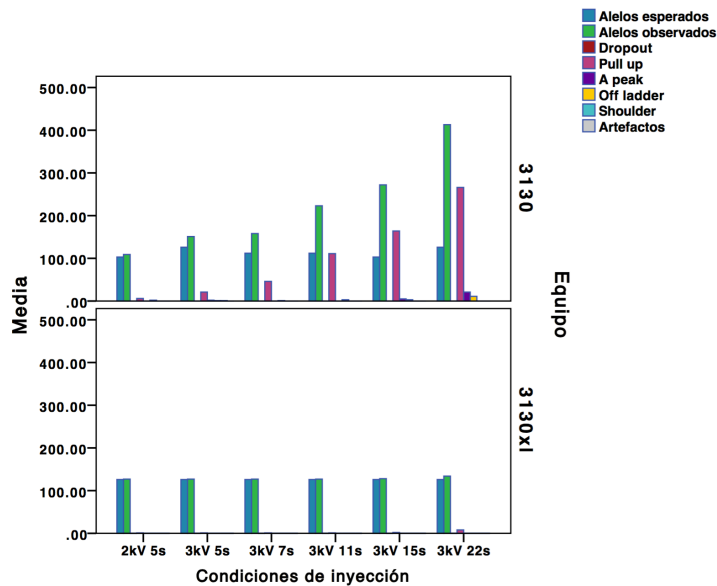


Figura 5: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 24 ciclos con reacción completa y cuartos de reacción, en el analizador genético 3130

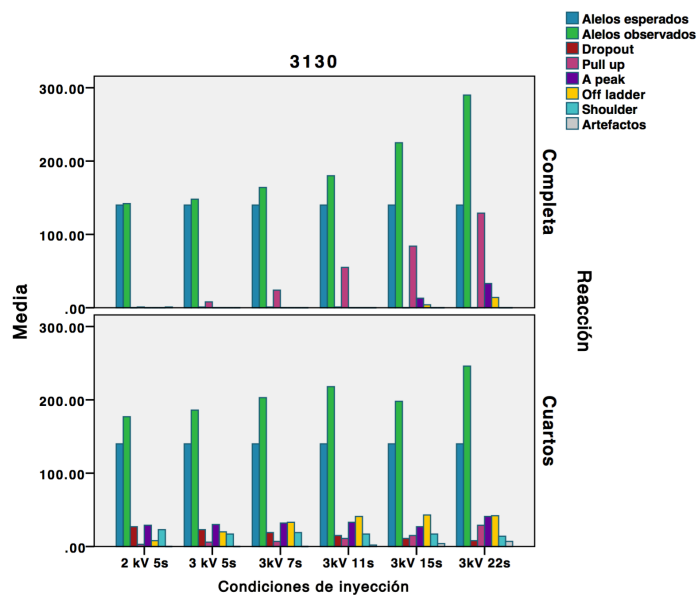
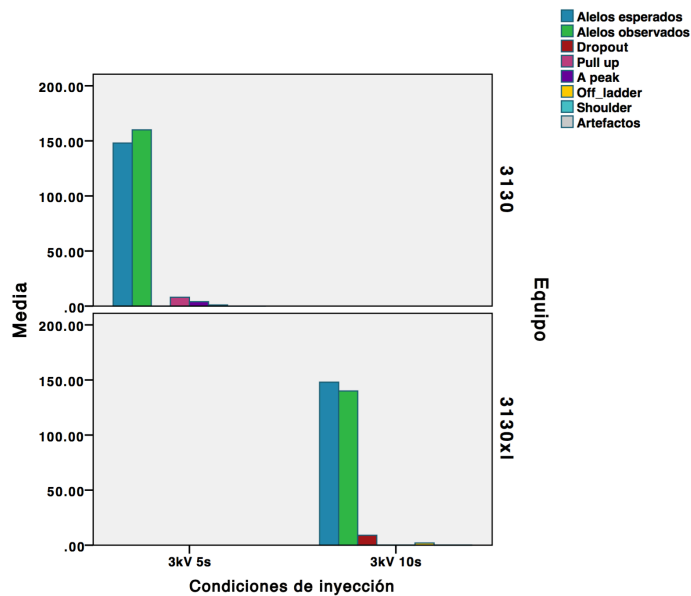


Figura 6: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de referencia amplificadas por una PCR de 23 ciclos con reacción completa, en los analizadores genéticos 3130 y 3130xl.



De igual manera se llevó a cabo una comparación de los alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos presentes en la amplificación de muestras de evidencia para los

programas de PCR con 25 ciclos (Figura 7) y 27 ciclos (Figura 8) para determinar las mejores condiciones de amplificación.

Figura 7: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de evidencia a distintas concentraciones amplificadas por una PCR de 25 y 27 ciclos con reacción completa, en el analizador genético 3130 a la condición de inyección 3kV y 15 s.

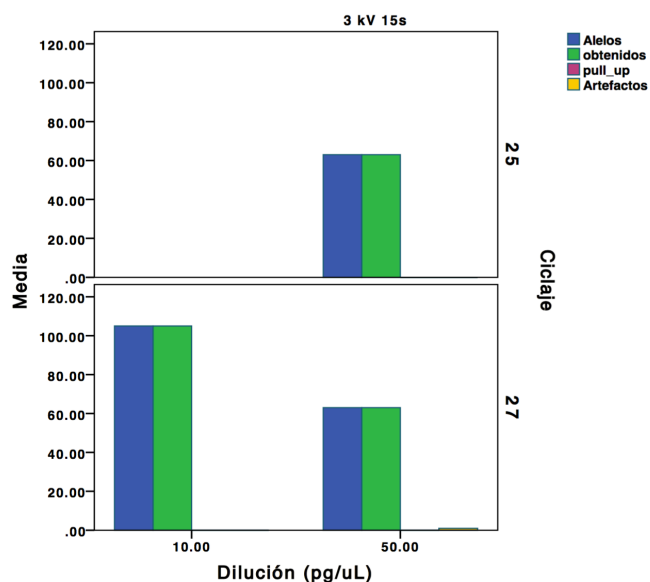
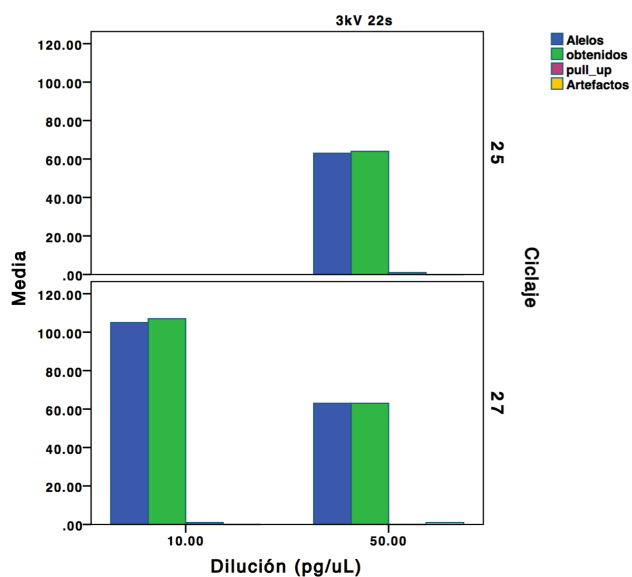


Figura 8: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos, para muestras de evidencia a distintas concentraciones amplificadas por una PCR de 25 y 27 ciclos con reacción completa, en el analizador genético 3130xl a la condición de inyección 3kV y 22s.



B. Fase de validación

1. Sensibilidad

a. Parámetros de análisis. Se definió los parámetros de análisis necesarios para la interpretación de resultados en el software GeneMapper ID ® versión 3.2.1 para las diferentes condiciones de inyección. Estos parámetros se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Parámetros de análisis definidos para distintas condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl

	3kV 10s	3kV 15s	3kV 20s
Altura promedio picos de línea base (URF)	2.46	2.75	2.8
Desviación estándar	1.26	1.77	1.94
Umbral de detección (URF)	6.24	8.06	8.61
Límite de análisis (URF)	15.05	20.43	22.18
Umbral estocástico (URF)	142	217	298

b. Rango dinámico. Se determinó los límites superiores e inferiores de las concentraciones a las cuales se obtienen perfiles aceptables para los distintos tipos de muestra analizados a diferentes condiciones de inyección. Estos resultados se pueden observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Límites superior e inferior para cada tipo de muestra a distintas condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl

Condiciones de inyección	Límite superior		Límite inferior	
3 kV 10 s	<i>Sangre</i>	FTA pura	<i>Sangre</i>	1:04
	<i>FTA</i>	FTA pura	<i>FTA</i>	TE
	<i>Chelex®</i>	100 pg/ul	<i>Chelex®</i>	50 pg/ul
	<i>Evidencia</i>	100 pg/ul	<i>Evidencia</i>	12.5 pg/ul
	<i>Hueso</i>	100 pg/ul	<i>Hueso</i>	6.25 pg/ul
3 kV 15 s	<i>Sangre</i>	FTA pura	<i>Sangre</i>	1:04
	<i>FTA</i>	FTA pura	<i>FTA</i>	1:08
	<i>Chelex®</i>	100 pg/ul	<i>Chelex®</i>	50 pg/ul
	<i>Evidencia</i>	100 pg/ul	<i>Evidencia</i>	12.5 pg/ul
	<i>Hueso</i>	100 pg/ul	<i>Hueso</i>	6.25 pg/ul
3 kV 20 s	<i>Sangre</i>	FTA pura	<i>Sangre</i>	1:08
	<i>FTA</i>	FTA pura	<i>FTA</i>	1:04
	<i>Chelex®</i>	100 pg/ul	<i>Chelex®</i>	25 pg/ul
	<i>Evidencia</i>	100 pg/ul	<i>Evidencia</i>	12.5 pg/ul
	<i>Hueso</i>	100 pg/ul	<i>Hueso</i>	6.25 pg/ul

c. Rango ideal. En el Cuadro 4 se muestran los rangos de concentración ideal en las que menos del 10% de los picos observados se deben a artefactos. Los resultados se muestran para los distintos tipos de muestra a diferentes condiciones de inyección.

Cuadro 4: Concentración ideal para cada tipo de muestras a diferentes condiciones de inyección para el analizador genético 3130xl

Condiciones de inyección	Tipo de muestra	Concentración
3 kV 10 s	<i>Sangre</i>	1:04
	<i>FTA</i>	FTA pura y TE
	<i>Chelex®</i>	100-50 pg/ul
	<i>Evidencia</i>	75-50 pg/ul
	<i>Hueso</i>	100 - 6.25 pg/ul
3 kV 15 s	<i>Sangre</i>	1:04
	<i>FTA</i>	FTA pura y TE
	<i>Chelex®</i>	100-50 pg/ul
	<i>Evidencia</i>	75-50 pg/ul
	<i>Hueso</i>	100 - 6.25 pg/ul
3 kV 20 s	<i>Sangre</i>	-
	<i>FTA</i>	FTA pura, TE y 1:4
	<i>Chelex®</i>	50 pg/uL
	<i>Evidencia</i>	100-12.5 pg/ul
	<i>Hueso</i>	75 – 6.25 pg/ul

d. Balance de heterocigotos. Para las muestras referenciales se determinó que el Porcentaje de imbalance de heterocigotos (PHR, por sus siglas en inglés) aceptado es de 0.40. De acuerdo a la altura de picos de los alelos heterocigotos en las muestras de evidencia se definieron dos grupos de concentraciones: 100-50 pg/ul y 25-6.25 pg/ul para establecer el PHR para cada condición de inyección.

Cuadro 5: PHR aceptados para las muestras de evidencia y esqueléticas para cada condición de inyección en el analizador genético 3130xl

Tipo de muestra	Condiciones	Concentración (pg/uL)	Promedio de altura (URF)	PHR
Evidencia	3kV 10s	100-50	405	0.39
		25-6.25	316	0.33
	3kV 15s	100-50	429	0.32
		25-6.25	480	0.43
	3kV 20s	100-50	572	0.44
		25-6.25	450	0.20
Esqueléticas	3kV 10s	100-50	1114	0.86
		25-6.25	519	0.75
	3kV 15s	100-50	1359	0.87
		25-6.25	837	0.73
	3kV 20s	100-50	1754	0.87
		25-6.25	1046	0.73

A continuación se muestran gráficamente los PHR de los picos heterocigotos para cada dilución además del límite aceptado de PHR. Se muestran los resultados para las muestras de sangre fijadas en tarjetas FTA (Figura 9), muestras extraídas por Chelex® (Figura 10), muestras de saliva fijadas en tarjetas FTA (Figura 11), extractos de evidencia (Figura 12) y extractos de muestras esqueléticas (Figura 13).

Figura 9: Balance de picos heterocigotos para las muestras de sangre, a siete distintas diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64), fijadas en tarjetas FTA a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl

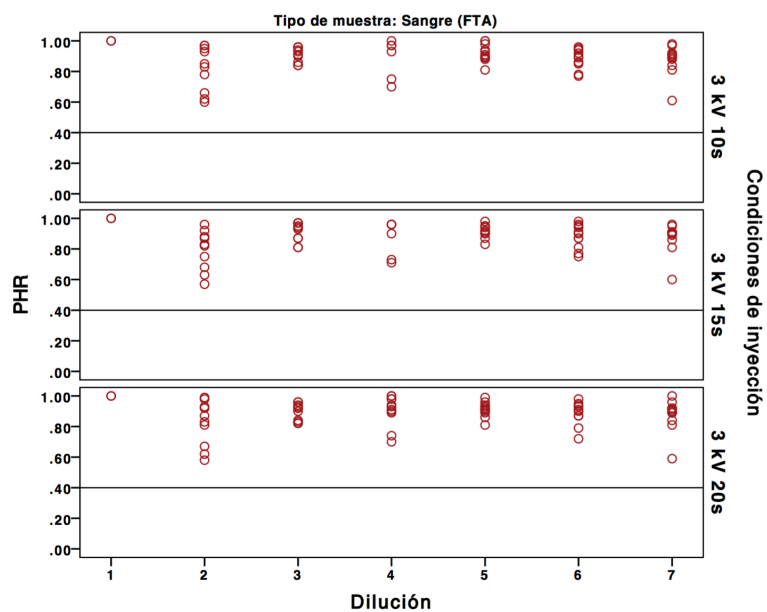


Figura 10: Balance de picos heterocigotos para las muestras extraídas por Chelex®, a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl

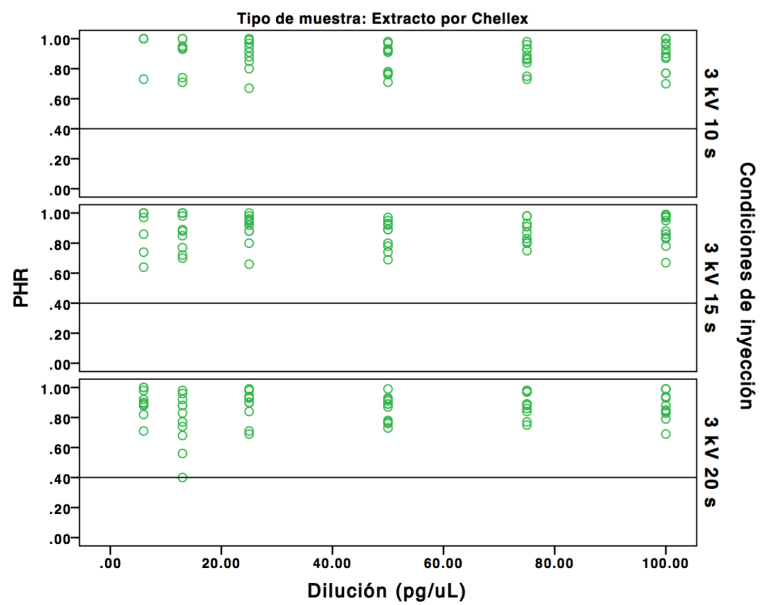


Figura 11: Balance de picos heterocigotos para las muestras de saliva, a siete distintas diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64), fijadas en tarjetas FTA a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl

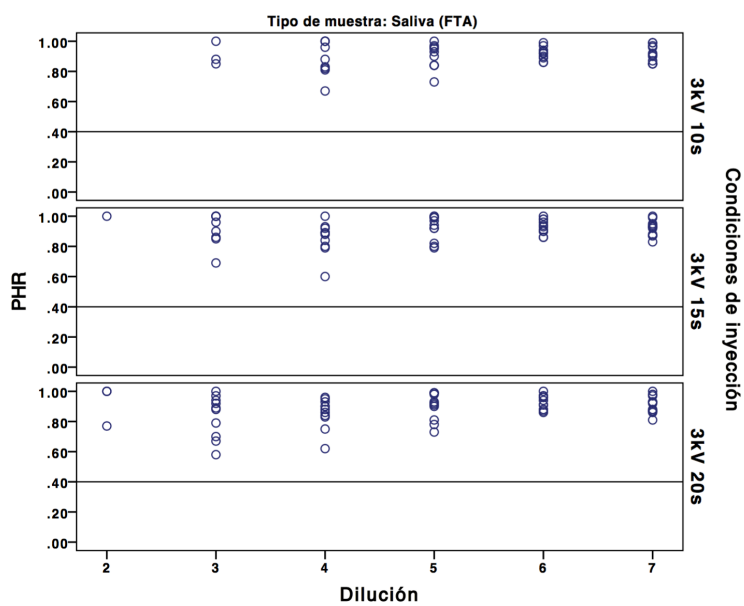


Figura 12: Balance de picos heterocigotos para los extractos de evidencia, a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl

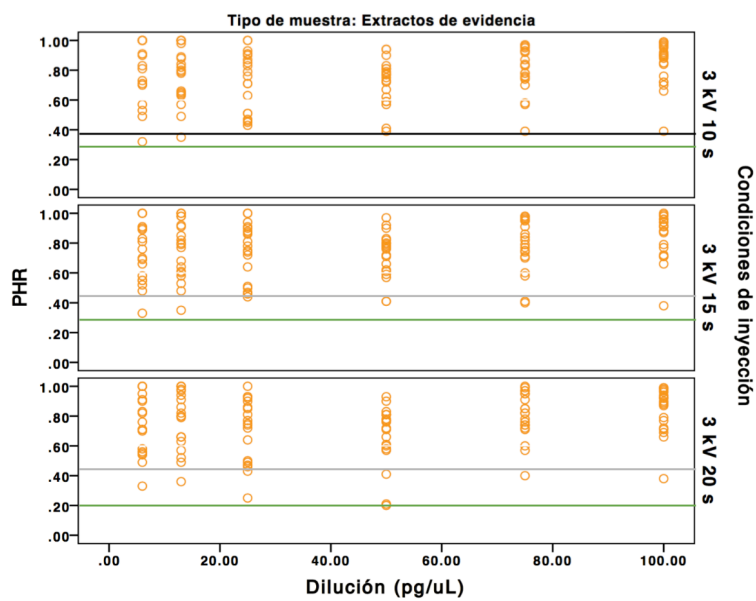
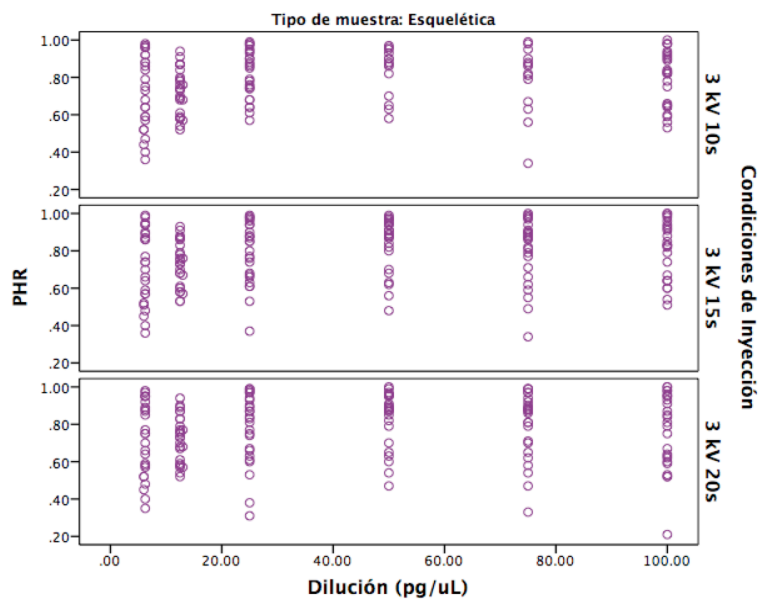


Figura 13: Balance de picos heterocigotos para los extractos de muestras esqueléticas a seis concentraciones, a diferentes condiciones de inyección en el analizador genético 3130xl



e. Tartamudeo. En el Cuadro 6 se muestra la proporción entre los picos reales y los picos de tartamudeo que se observan para todos los tipos de muestra a diferentes condiciones de inyección. Se muestra además la altura promedio de los picos reales y del tartamudeo.

Cuadro 6: Altura de picos reales y picos de tartamudeo y la proporción entre los mismos a diferentes condiciones de inyección

Condiciones de inyección	Altura promedio		Proporción de picos
	Tartamudeo	Pico real	
3 kV 10 s	36	528	8.30%
3 kV 15 s	45	705	7.06%
3 kV 20 s	58	906	8.18%

f. Cantidad de BTO y precisión de la escalera. En el Cuadro 7 se muestra la altura promedio de los picos del estándar de tamaño dependiendo de la cantidad añadido del mismo a diferentes condiciones de inyección.

Cuadro 7: Altura de picos del estándar de tamaño dependiendo de la cantidad de BTO añadida a las escaleras alélicas, a diferentes condiciones de inyección.

Condiciones de inyección	Cantidad BTO	Promedio de altura
3kV 10s	0.10	85
	0.25	121
	0.50	229
3kV 15s	0.10	122
	0.25	160
	0.50	310
3kV 20s	0.10	156
	0.25	198
	0.50	371

Con las escaleras utilizadas para el análisis de BTO se determinó la precisión con las que estas generan el tamaño de cada alelo. Se determinó que la desviación estándar promedio para todos los alelos fue de ± 0.06 pares de bases.

2. Mezclas de ADN. A continuación se muestran los resultados obtenidos para las mezclas de ADN. En el Cuadro 8 se muestran los porcentajes de alelos observados para el contribuyente mayoritario y minoritario. Por otra parte, en el Cuadro 9 se muestran las proporciones de las alturas obtenidas para estos alelos observados en cada una de las mezclas.

Cuadro 8: Alelos amplificados del contribuyente mayoritario y minoritario a diferentes proporciones y condiciones de inyección

Condiciones de inyección	Proporción		% alelos compartidos	% alelos no compartidos	% de alelos del mayoritario	% de alelos del minoritario
	A	B				
3kV 10s	9	1	9%	91%	100%	29%
	3	1	9%	91%	100%	86%
	1	1	9%	91%	100%	100%
3kV 15s	1	3	9%	91%	65%	100%
3kV 20s	1	9	9%	91%	13%	100%

Cuadro 9: Proporción de altura de los alelos observados para el contribuyente mayoritario y minoritario a diferentes condiciones de inyección

Condiciones de inyección	Proporción		Proporción promedio de altura
	Muestra A	Muestra B	
3kV 10s	9	1	2.07*
	3	1	2.12
	1	1	1.83
	1	3	3.33
	1	9	6.48*
3kV 15s	9	1	2.07*
	3	1	2.13
	1	1	1.78
	1	3	3.24
	1	9	6.49*
3kV 20s	9	1	2.06*
	3	1	2.11
	1	1	1.79
	1	3	3.24
	1	9	6.48*

*Tomar en cuenta que la minoría de los alelos fueron amplificadas para el componente

*Tomar en cuenta que se calculó con los alelos amplificadas para el minoritario.

3. Repetitividad y reproducibilidad. Para los cinco tipos de muestras (FTA saliva, FTA sangre, extractos de Chelex®, evidencia y muestras esqueléticas) se obtuvo coincidencia en los perfiles obtenidos en triplicado para las condiciones de inyección 3kV 10s, 3kV 15s y 3kV 20 s. Además estos perfiles en triplicado coinciden para los tres termocicladores utilizados para la amplificación de las muestras.

4. Contaminación. Se realizó una valoración de contaminación a 77 negativos y blancos de reactivos trabajados a lo largo de la validación. Se encontró 4 incidentes de contaminación, sin embargo se observó controles negativos limpios en un 95% de los casos.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Fase preliminar

El objetivo de esta fase consistía en determinar las condiciones óptimas de inyección y de amplificación del kit *Investigator Argus X-12*. Para las muestras de referencia se probó inicialmente el programa de ciclaje de 25 ciclos recomendado por el kit para un alto número de copias (ver Cuadro 1). Para el analizador genético 3130xl de los 756 alelos esperados se observaron 770. De estos, 14 eran debido a *pull-ups* (señal de un alelo marcado para un colorante, que se observa como un pico en otro color). Sin embargo para el analizador 3130 de los 682 alelos esperados se observaron 1326. Como se puede observar en la Figura 4 de estos 28 eran artefactos de adenilaciones incompletas, 21 eran picos fuera de escalera, 1 era elongación de un pico y 614 eran *pull-ups*. Estos totales combinan los resultados de todas las condiciones de inyección aunque, como puede observarse en la figura, para cada condición de inyección la cantidad de artefactos observados iba aumentando, como es de esperarse. Una de las razones por las que aparecen un alto número de artefactos es porque hay mucho ADN amplificado en la muestra, por lo que se decidió disminuir el ciclaje del programa hasta llegar a las condiciones óptimas.

La segunda prueba se realizó con un programa de 24 ciclos en el analizador genético 3130; además se decidió probar en estas condiciones el utilizar reacción completa o cuartos de reacción. Trabajar con cuartos de reacción podría representar una ventaja para la FAFG ya que de esta manera se optimizarían los recursos disponibles para las identificaciones y filiaciones. Como se puede observar en la Figura 5, para los cuartos de reacción de los 826 alelos esperados se observaron 1228. Al igual que para la reacción con 25 ciclos, los totales se observan para todas las condiciones de inyección y el patrón de incremento de artefactos coincide con el incremento de las condiciones.

De estos 71 eran *pull-ups*, 192 adenilaciones incompletas, 187 fuera de escalera, 107 elongaciones de picos y 13 artefactos de otros tipos. Estos artefactos se deben a que al agregar un menor volumen de los reactivos de PCR y utilizar un ponche de FTA hay muchas copias de ADN que no pueden terminar la elongación y que por lo tanto resultan en artefactos. Debido a que no se puede disminuir la cantidad de ADN presente en las tarjetas de FTA que se utilizarán posteriormente, para el uso del kit, se decidió continuar únicamente con reacciones completas. En la misma Figura se observan los resultados para la reacción completa en donde de los 798 alelos esperados se observaron 1149. Se observaron 46 adenilaciones incompletas, 18 fuera de escalera y 1 artefacto además de 301 *pull-ups* razón por la cual se decidió disminuir un ciclo más en el programa de PCR.

En la Figura 6 se observa la comparación de resultados entre el analizador genético 3130 y 3130xl utilizando un programa de 23 ciclos. Debido a que en las primeras dos pruebas se había realizado un análisis más amplio de las condiciones de inyección, para esta prueba se decidió analizar únicamente las condiciones de inyección recomendadas por el fabricante (3kv 5s para el 3130 y 3kv 10s para el 3130xl). Para el 3130xl de los 148 alelos esperados se observaron 139 debido a 9 *drop outs* (alelos no amplificados). Sin embargo, todos estos *drop outs* se observaron en una sola muestra por lo que puede atribuírsele a esta muestra y no a la cantidad de ciclajes. Como se mencionó anteriormente en esta fase se trabajó con muestras en tarjeta FTA. En vista a los resultados obtenidos para esta muestra con *drop outs*, se puede suponer que se seleccionó una región de la FTA en la que la concentración de ADN era muy baja y que por lo tanto presentó problemas en la amplificación. De igual manera para el 3130 de los 148 alelos esperados se observaron 160, de los cuales 8 eran *pull-ups*. Todos estos se observaron también en una sola muestra por lo que se puede concluir que este es el programa ideal para las amplificaciones de muestras referenciales.

La misma prueba se debía realizar para las muestras de evidencia. De acuerdo al desarrollador del kit, las muestras con bajo número de copias debían amplificarse con un

programa de 27 ciclos. Como se muestra en las Figuras 7 y 8 las pruebas se realizaron con un programa de 25 y uno con 27. Se decidió probar con dos concentraciones: 50 pg/uL y 10 pg/uL de manera que se probaran altas y bajas concentraciones de ADN. Para 25 ciclos se observaron los 63 alelos esperados para las muestras a 50 pg/uL en las condiciones de 3kV 15s y 3kV 22s. Para el programa de 27 ciclos tanto a 3kV 15s y 3kV 22s se obtuvieron los 63 alelos esperados. Con la concentración de 10 pg/uL a 3kV 15s se observaron los 105 alelos esperados mientras que a 3kV 22s se observaron 107 debido a la presencia de dos artefactos (un *pull-up*). Debido a que con el programa de 27 ciclos tanto las muestras a 50 pg/uL como las de 10 pg/uL amplificaron correctamente, se determinó que este programa era el óptimo para la amplificación de muestras de evidencia y por lo tanto también para muestras esqueléticas.

B. Fase de validación

Una vez determinado el ciclaje se prosiguió a realizar los estudios de sensibilidad, reproducibilidad, repetitividad, mezclas de ADN y contaminación. En la etapa de sensibilidad se midieron ciertos parámetros de la amplificación. En primer lugar, con respecto a los parámetros de análisis, se muestra en el Cuadro 2 que el límite de análisis, que es el que se utilizará posteriormente para el análisis de los perfiles en GeneMapper ID ® r, se encuentra entre 15 y 22 URF por lo que para mantener uniformidad dentro de las inyecciones se considerará de 20 URF . Quedaría entonces el umbral de detección a 8 URF, límite de análisis a 20 URF y el umbral estocástico a: 140 URF (3kV 10s), 220 URF (3kV 15s) y 300 URF (3kV 20s). Este límite de análisis nos permite identificar que por debajo de estas condiciones los picos observados serán considerados como ruido o picos no reales.

Los instrumentos utilizan la curva normal para establecer la relación entre la detección de señal y el tamaño de los picos. Sin embargo, debido a que los equipos de electroforesis capilar siempre presentarán ruido electrónico en los electroferogramas por la presencia de los químicos y marcadores fluorescentes, es necesario establecer límites que diferencien un pico real del

ruido. Para calcular correctamente este dato es necesario tomar en cuenta para el umbral de detección tres veces la desviación estándar de los picos de la línea base y para el límite de análisis 10 veces la desviación estándar de los picos de la línea base. Esto se debe a que por encima de las tres desviaciones estándar se garantiza que hay una probabilidad de entre 95-99.7% de que los picos no sean ruido, sin embargo debido a que estos picos aún pueden tener una señal contaminada por el ruido se recomienda utilizar el límite de análisis de 10 desviaciones estándar. A pesar de que por ser picos se podría utilizar el umbral de detección para la determinación de alelos, debido al uso de proporciones de altura de picos se recomienda que para el uso de STR se utilice el límite de análisis. El umbral de detección puede ser utilizado como un indicio de algún alelo que no fue amplificado correctamente, pero que podría ser un pico real si se realiza una re-inyección o re-amplificación.

El umbral estocástico, como se muestra en el Cuadro 2 es considerablemente diferente para cada una de las condiciones de inyección, como era de esperar debido a la intensidad con que se inyecta cada muestra, por lo que se estableció uno diferente para cada condición. Este límite determina que todos aquellos loci en los que se observe un solo pico, si su altura es mayor a la de este límite entonces puede considerarse como un alelo realmente homocigoto y no únicamente una consecuencia de los efectos estocásticos. En vista de lo observado con estos resultados se puede determinar que este kit es sensible a los *drop-outs* por lo que este límite debe ser más alto que el límite de análisis. Se determinó además que este límite se utilizará únicamente para las muestras femeninas y el loci de la amelogenina en las muestras masculinas. Esto se debe a que por las características de los cromosomas sexuales, no es que las muestras masculinas sean heterocigotos para todos los loci sino que se debe a que el perfil del cromosoma X en muestras masculinas es un haplotipo.

Luego se llevaron a cabo las pruebas para la determinación del rango dinámico y del rango ideal de concentraciones de ADN a utilizar con este kit. Como se muestra en el Cuadro 3 utilizando las condiciones de inyección más altas (3kV 20s) se puede determinar que para las

muestras fijadas en FTA (sangre y saliva) el límite superior son las tarjetas puras mientras que para los extractos (Chelex®, evidencia y muestras esqueléticas) el límite superior son 100 pg/uL, concentración más alta probada. Debido a la naturaleza de las muestras fijadas en FTA, estas no pueden ser cuantificadas previo a su amplificación. Esto provoca que no todas las muestras amplificadas, aunque provengan de la misma tarjeta, tendrán la misma cantidad de ADN inicial en la amplificación. Estas concentraciones como se mencionó anteriormente son las más altas que se probaron en estas pruebas de sensibilidad y no se observó ningún problema en la amplificación. Sería por lo tanto recomendable hacer pruebas con concentraciones más altas hasta evidenciar una concentración en la que se empieza a dar problemas de amplificación. Con los resultados obtenidos se puede decir que si se trabaja con 100 pg/uL se ha corroborado que es suficiente cantidad de ADN para una correcta amplificación de todos los loci.

El límite inferior se definió utilizando las condiciones más bajas de inyección (3kV 10s) mostradas en el Cuadro 4 de la siguiente manera: para las muestras de sangre en FTA en una dilución de 1:4, para las de saliva para la dilución inicial en 1.5 mL de TE, para los extractos de Chelex® a 50 pg/uL, para evidencia 12.5 pg/uL y hueso 6.25 pg/uL. En el caso de las muestras de sangre fijadas en tarjetas FTA se observa que aún con una muestra diluída es posible obtener perfiles completos, lo cual nos permite contrarrestar el problema de la cuantificación de estas muestras. De igual manera para las muestras de saliva fijadas en tarjeta FTA, se observa que aún en una dilución en 1.5mL de TE es posible encontrar perfiles de las muestras, lo que también es útil debido a la irregularidad de las muestras de saliva que se manejan en dichas tarjetas. Sin embargo, debido a la irregularidad de las muestras en algunos casos se puede obtener perfiles parciales. Esto se puede deber a que la muestra está muy diluída, por lo que se recomendaría tomar un *punch* de otro lugar en la tarjeta. Si aún así el problema persiste, sería necesario tomar otra muestra para poder llevar a cabo la amplificación. En el caso de los extractos de las muestras se puede observar que las muestras de evidencia y hueso son más tolerantes a bajas concentraciones. Los extractos de evidencia dejaron de presentar perfiles completos a 6.25 pg/uL por lo que el límite inferior se dejó en 12.5 pg/uL. Por otra parte, los

extractos de hueso comienzan a dar indicios de pull-ups a una concentración de 6.25 pg/uL. Se recomienda probar con una concentración más baja para evidenciar si 6.25 pg/uL es realmente el límite inferior o si aún puede trabajarse con una menor concentración. Esto puede deberse a la naturaleza del extracto de Chelex®, el cual tiene más inhibidores debido a la falta de purificación en el proceso de extracción.

La obtención de un rango dinámico amplio en las muestras de evidencia y hueso es una ventaja ya que usualmente estas muestras presentan bajas concentraciones de ADN, además de un alto contenido de inhibidores y de degradación. Por lo tanto determinar que aún una concentración de 6.25 pg/uL puede ser amplificada correctamente con el kit *Investigator Argus X-12* representa una ventaja para la FAFG. Como era de esperarse el rango ideal debía encontrarse dentro de estos límites. Estas concentraciones se muestran en el Cuadro 4 para cada una de las condiciones de inyección. En vista de que estas son las concentraciones ideales, serán estas las concentraciones recomendadas para la amplificación de muestras posteriormente.

Debido a la falta de muestras femeninas de hueso con altas concentraciones de ADN para estas pruebas, se trabajó con una muestra fresca de diente. Las condiciones de esta muestra, además de una alta concentración de ADN, presentaban poca degradación lo que facilita la amplificación. Las muestras con las que se trabaja usualmente se encuentran más degradadas por lo que se sugiere trabajar con la mayor cantidad de ADN posible, dentro del rango establecido anteriormente. De igual manera se trabajó con muestras masculinas y se obtuvo buenos resultados por lo que se espera que con estas concentraciones sí se pueda trabajar correctamente.

Para las pruebas de desequilibrio de heterocigotos era necesario calcular el PHR (*peak height ratio*) esperado para el análisis de los mismos en las distintas concentraciones. El cálculo de estos PHR esperados se trabajó de manera diferente para las muestras referenciales que

para las de evidencia y esqueléticas. Esto se debe a que debido a que las muestras referenciales tienen un mayor contenido de ADN, se espera que los perfiles que se obtengan sean completos y los heterocigotos sean balanceados, ambos picos de la misma altura, mientras que las muestras de evidencia y huesos al tener bajo contenido de ADN se espera recuperar la mayor cantidad de información posible de cada perfil. Para las muestras referenciales se estableció como PHR el valor mínimo obtenido (0.40) para este tipo de muestras. De acuerdo a Butler (2015) usualmente se utiliza entre un 50-60% de imbalance ya que conforme disminuye la concentración de ADN así aumenta el imbalance entre los picos.

Revisando a que muestra corresponde el valor mínimo de 0.40 se observó que este porcentaje se presentó en una muestra a 12.5 pg/uL, lo cual corresponde a una baja concentración de ADN. Si se toma en cuenta el siguiente valor se observa que hay un imbalance de 0.56 el cual se encuentra entre el rango típico. También era posible determinarlo a partir del promedio menos tres desviaciones estándar, sin embargo se decidió utilizar el mínimo debido a que este es más conservador y de esta manera se toma en cuenta realmente el valor más bajo que se ha observado y de esta manera poder generalizar para futuras muestras. En la Figura 9 se observan los resultados obtenidos para las muestras de sangre fijadas en tarjetas FTA.

Se evidencia que conforme aumenta la concentración disminuye proporcionalmente la cantidad de desequilibrios. Esto se debe a que con concentraciones óptimas de ADN, para cada locus existe un número de copias idénticas para cada uno de los alelos. Sin embargo, cuando estas condiciones no son las óptimas comienza a variar el número de copias entre alelos, generando así imbalance en los alelos heterocigotos (Leclair, *et al.*, 2004). Además se puede observar que todos los puntos, sin importar la concentración se encuentran por encima del límite fijado. Este mismo comportamiento se observa para las muestras extraídas por Chelex® (Figura 10) y las muestras de saliva fijadas en tarjetas FTA (Figura 11).

Para las muestras de evidencia se calculó el PHR aceptado para cada condición de inyección dependiendo de la concentración de los picos. Se dividieron los datos en dos grupos: las concentraciones más altas (100-50 pg/uL) y las más bajas (25-6.25 pg/uL). Estos grupos se definieron dependiendo del comportamiento con respecto a efectos estocásticos, ausencia de uno de los dos picos esperados. Para las muestras de evidencia en el Cuadro 5 se muestran los límites establecidos. Para las condiciones de 3kv 10s se puede observar que aún con el límite del grupo más alto, la mayoría de los puntos se encuentran por encima del límite. Además al igual que para las muestras referenciales se puede observar que a todas las condiciones de inyección, conforme más concentrada se encuentra la muestra disminuye así el desequilibrio entre los picos.

Podemos observar que a mayores condiciones de inyección la diferencia entre los límites es más evidente debido a que conforme más altos son los picos (por las condiciones) más evidente se hacen los desequilibrios. Para las muestras esqueléticas de igual manera se puede observar que conforme aumenta la concentración más balanceados están los picos. Como se muestra en el Cuadro 5 los PHR esperados para las muestras esqueléticas son mucho más altos que para los de las muestras de evidencia y esto se debe a que la muestra esquelética femenina utilizada tenía una alta concentración y bajos niveles de degradación por lo que fue mejor la amplificación de estas muestras. Se recomienda realizar la prueba de igual manera con muestras degradadas de manera que se establezca si estos límites están muy altos y si es necesario disminuir estos límites. En dado caso estos límites no funcionaran en muestras degradadas se puede considerar utilizar los establecidos para las muestras de evidencia, los cuales son considerablemente más bajos. Otro parámetro que se considera en las pruebas de sensibilidad es el tartamudeo negativo. Como se muestra en el Cuadro 6, la proporción de los picos de tartamudeo con respecto a los picos reales se encuentra entre 7-8% en todas las condiciones de inyección. Esta proporción indica que todos los picos que representen el 8% de la altura del pico real pueden ser descartados y considerados como un efecto de tartamudeo en la

amplificación. Se revisó adicionalmente las muestras para determinar tartamudeo positivo en la amplificación, sin embargo no se evidenció su presencia.

La precisión de la escalera alélica y la cantidad de estándar de tamaño (BTO) se midieron simultáneamente. En el Cuadro 7 se muestra la altura y tamaño de los picos del estándar a diferentes condiciones de inyección y a diferentes cantidades de BTO. Conforme aumenta la cantidad de estándar añadido la altura de los picos aumenta. Sin embargo cuando se probó estas cantidades de BTO con muestras se observó que con 0.10 uL de BTO el estándar fallaba y no se podían obtener los perfiles. Por esta razón se concluye que se puede utilizar únicamente 0.25 y 0.50 uL de BTO. Por otra parte con respecto a la precisión de la escalera alélica esta se midió con las tres cantidades de BTO (0.10, 0.25 y 0.5 uL) y para cada alelo se determinó la desviación estándar de cuatro escaleras a las condiciones de inyección 3kV 10s, 3kV 15s y 3kV 20s. Para validar como precisa la escalera se determinó que la desviación estándar no debía ser más de ± 0.5 pares de bases. La desviación se calculó para cada alelo y posteriormente se sacó el promedio de estas desviaciones. Se determinó que la desviación promedio era de ± 0.06 por lo que se puede concluir que la escalera alélica es precisa.

Posteriormente se hizo una valoración de mezclas de ADN. El objetivo de este estudio consistía en demostrar que, aún es posible detectar una mezcla cuando esta se encuentra mezclada. Además este kit se puede utilizar en muestras de trazas (evidencia) ya que se pueden obtener perfiles femeninos de trazas detrás de las uñas de un agresor masculino, por ejemplo. Para ello se utilizó una muestra femenina y una masculina que compartían un 9% de los alelos en sus perfiles. Los resultados se muestran en el Cuadro 8 y se puede observar que estos coinciden para las tres condiciones de inyección. En la mezcla en donde la proporción de las muestras era 1:1 se obtuvo el 100% de los perfiles para ambas muestras. Si se comparan los porcentajes de alelos obtenidos para el minoritario se puede observar que en las mezclas donde la muestra femenina era mayoritaria se observa un mayor porcentaje de los alelos del minoritario. Mientras que cuando la muestra masculina es la mayoritaria se obtuvo un menor

porcentaje de la muestra femenina. Una de las razones para estas diferencias es que de la muestra masculina se esperaban 14 alelos y de la femenina 23 por lo que si se toman en cuenta los alelos compartidos, estos representarán un porcentaje más alto para la muestra masculina que para la femenina.

En el Cuadro 9 se muestra la proporción observada de los picos, la cual se buscaba que coincidiera con la proporción de ADN agregada a la reacción. Como se puede observar el comportamiento para las tres condiciones de inyección es similar por lo que el análisis se realizará por proporciones. Para las mezclas 1:1 y 1:3 (en donde el mayoritario era una muestra masculina) se puede observar que la proporción de la altura de los picos coincide con la esperada. Para las mezclas 3:1 (en donde el mayoritario era una muestra femenina) se obtuvo una proporción de 2 a 1. Esto se puede deber a que para las muestras masculinas sólo es necesario amplificar un alelo por cada loci, mientras que para las femeninas dos. Esto ocasionaría que los reactivos de la amplificación se distribuyan mejor entre las muestras y que los alelos del femenino no se amplifiquen tanto como lo harían al ser la muestra masculina la mayoritaria. Por último, para las mezclas 9:1 y 1:9 las proporciones no se acercan a las esperadas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para el cálculo de estos promedios se tomó en cuenta únicamente los alelos que sí amplificaron del contribuyente minoritario, debido a la alta presencia de *drop-outs*, por lo que el promedio no es tan representativo como en las otras mezclas.

Para las pruebas de repetitividad y reproducibilidad se utilizaron 10 muestras representativas de todos los tipos de extracción que se utilizan. Se observó una coincidencia de perfiles entre los triplicados, los cuales además fueron amplificados en distintos termocicladores. Estas pruebas permiten comprobar que sin importar en qué termociclador se lleve a cabo la PCR, los resultados de amplificación serán los mismos. Por último es importante tomar en cuenta la valoración de contaminación de los negativos y blancos de reactivos trabajados. Se observó un 95% de casos en los que sí se obtuvo un resultado negativo únicamente 4 incidentes

de contaminación. Los alelos observados para estos incidentes coinciden con alguno de los perfiles amplificados en esa reacción, lo cual permite identificar que la causa de esta contaminación se dió durante el procedimiento y no por contaminación del kit. Estos incidentes se obtuvieron en reacciones independientes por lo que no se debe a que alguno de los reactivos estuviese contaminado. Debido a que esta contaminación se dio en el procedimiento esta puede ser causada por un descuido en la amplificación de las muestras, por lo que se recomienda trabajar con cuidado las muestras durante todo el proceso. Por lo tanto se puede concluir que el kit pasa la prueba de contaminación.

Por último cabe mencionar que se tenía planificado realizar la validación en ambos analizadores genéticos (3130 y 3130xl), sin embargo por motivos ajenos a este proyecto el analizador 3130 fue catalogado como fuera de servicio temporalmente y no se pudo llevar a cabo la validación en este equipo. Se recomienda de igual manera que, al habilitar nuevamente este equipo se lleve a cabo la validación para este equipo. Es importante validar el kit en ambos equipos ya que la óptica y sensibilidad de ambos equipos varía por lo que no todos los límites y parámetros determinados para el análisis en el 3130xl se pueden extrapolar al otro equipo.

VIII. CONCLUSIONES

- Se estandarizó y validó la metodología para la amplificación de marcadores STRs humanos en muestras de tejidos usados como evidencia, muestras referenciales y muestras esqueléticas por la Fundación de Antropología Forense de Guatemala, utilizando el kit *Investigator Argus-X12*.
- Utilizando el kit *Investigator Argus X-12*, se determinó que para muestras de evidencia y muestras esqueléticas debe utilizarse un programa de PCR con 27 ciclos. Además se pueden utilizar las condiciones de inyección: 3kV 10s, 3kV 15s y 3kV 20s.
- Con base en los resultados obtenidos se concluye que para las muestras de referencia se debe utilizar un programa de PCR con 23 ciclos. Además debido a la cantidad de artefactos obtenidos utilizando cuartos de reacción se estableció que se puede utilizar únicamente a reacción completa. Las condiciones de inyección que se pueden utilizar son: 3kV 10s, 3kV 15s y 3kV 20s.
- Para el kit *Investigator Argus X-12*, se estableció un rango ideal de concentración de: sangre pura a una dilución 1:4 para muestras de sangre fijadas en tarjetas FTA, una muestra pura a una dilución en 1.5mL de TE para muestras de saliva fijadas en tarjetas FTA, entre 100-50 pg/uL para extractos de Chelex®, 75-50 pg/ul para muestras de evidencia y entre 100-12.5 pg/ul para muestras esqueléticas.
- Se comprobó la repetitividad y reproducibilidad de los resultados obtenidos utilizando el kit *Investigator Argus X-12* para el analizador genético 3130 y los tres termocicladores 9700 presentes en el laboratorio.
- Se determinó un umbral de análisis de 20 URF para las condiciones de inyección de 3kV 10s, 3kV 15s y 3kV 20s y un umbral estocástico de: 140 URF (3kV 10s), 220 URF (3kV 15s) y 300 URF (3kV 20s).
- Se estableció un tartamudeo negativo de 8%, se evidenció para este kit una relación inversamente proporcional entre la concentración y el imbalance de los picos y se estableció que hasta en una proporción de 3:1 se obtiene un perfil significativo del contribuyente minoritario en una mezcla.

IX. RECOMENDACIONES

Para futuras validaciones se sugiere una detallada revisión tanto de los manuales del kit como de referencias bibliográficas en las que se haya utilizado el protocolo de interés. Esto puede brindar guías iniciales sobre las cuales basar el proceso de validación. Además se recomienda un manejo ordenado de los datos ya que se genera mucha información y si esta no se trabaja de manera ordenada se gastan recursos tanto materiales como de tiempo.

Se recomienda también que se realice desde etapas tempranas un plan de validación en el cual se organice tanto los reactivos, como el número y tipo de muestras que se evaluarán, de manera que se pueda optimizar no sólo el protocolo, como objetivo de la investigación, si no también el tiempo que se lleve la validación. Es recomendable también que se acuda a expertos no sólo en el tema, si no que también hayan pasado ya por un proceso de validación para que ellos puedan ayudar en la planificación y consejos durante el proceso.

Para esta validación en específico, como se mencionó anteriormente, se recomienda realizar la validación en ambos analizadores genéticos. Esto ya que la óptica de ambos no es la misma y por lo tanto algunos de los parámetros establecidos para el 3130xl pueden no ser válidos para el 3130. Se sugiere que para estas pruebas se utilicen las mismas muestras utilizadas en el primer equipo, de manera que se pueda evidenciar la repetitividad de los resultados.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Albarghouthi, M. y A. Barron. 2000. *Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*. 21: 4096-4111.
- [2]. Applied Biosystems. 2014. *User Guide – GlobalFiler PCR Amplification Kit*. Life Technologies.
- [3]. Applied Biosystems. 2010. *ABI PRISM dGTP BigDye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit*.
- [4]. Applied Biosystems. 2009. *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis*. Chemistry Guide. Second Edition. 310 pp.
- [5]. Ashcroft, J.; D. Daniels; S. Hart. 2002. *Using DNA to solve Cold Cases*. National Institute of Justice USA. 32 pp.
- [6]. Barbaro, A.; P. Cormaci; A. Barbaro. 2006. *X-STR typing for and identification casework*. International Congress Series. 1288: 513-515.
- [7]. Butler, L. 2012. *Advance Topics in Forensic DNA typing: methodology*. Academic Press. Ed. Ilustrada. 680 pp.
- [8]. Butler, J. y C. Hill. 2012. *Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis*. *Forensic Sc Rev*. 24:15, 2012.
- [9]. Butler, J. 2006. *Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing*. *J Forensic Sci*. 51(2): 253 – 265
- [10]. Butler, J. 2006. *Debunking some urban legends surrounding validation within the forensic DNA community*. *Profiles in DNA*.
- [11]. Butler, J. 2005. *Forensic DNA typing*. 2da E. Ed. Elsevier. Burlington, Estados Unidos. 660 pp.
- [12]. Cainé, L.; R. Carvalho; S. Costa; M. Pereira; M. Pinheiro. 2011. *Interest of X chromosome (Argus X-12 kit) in complex kinship analysis*. *Forensic Science International: Genetics Supplement*. 3(2011): e206-e207.
- [13]. *Casos de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala*. 2014. Recopilado el 16 de febrero 2015, de <http://wayback.archive-it.org/1068/20140623191453/http://www.fafg.org/paginas/casos.htm>
- [14]. Chakraborty, R.; D. Stivers; B. Su; Y. Zhong; B. Budowle. 1999. *The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems*. *Electrophoresis*. 20: 1682 – 1696.
- [15]. Cho, M. y P. Sankar. 2004. *Forensic genetics and ethical, legal and social implications beyond the clinic*. *Nat Genet*. 36(11): S8-S12.
- [16]. Cuadros, J.; L. Paredes; G. Ceballos. 2008. *Herramienta de software para el análisis de datos electroforéticos*. *Mecánica computacional*. 27: 3299-3315.

- [17]. DNA Database Forensic Scientist Manager and DNA Technical Leader. 2013. *DNA Database Procedure for autosomal DNA STR Interpretation*. Recopilado el 17 de febrero 2015, de <http://www.ncdoj.gov/getdoc/5871753b-7f0b-4733-b75c-823b27a38e1c/DNA-Database-Autosomal-DNA-STR-Interpretation-12-1.aspx>
- [18]. Edelman, J.; R. Lessig; M. Klintschar; R. Szibor. 2004. *Advantages of X-chromosomal microsatellites in deficiency paternity testing: presentation of cases*. International Congress Series. 1261: 257-259.
- [19]. Edwards, M. y R. Gibbs. 1994. *Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications*. PCR Methods and applications. 3:S65-S75.
- [20]. Elnifro, E.; A. Ashshi; R. Cooper; P. Klapper. 2000. *Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology*. Clinical microbiology reviews. 13(4): 559-570
- [21]. FBI. 2015. *Notice of release of the 2015 FBI Population Data for the expanded CODIS core STR loci*. Recopilado el 18 de enero 2016, de: <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/expanded-fbi-str-2015-final-6-16-15.pdf>
- [22]. Filho, A.; S. Ferreira; S. Oliveira. 2013. *Impact of a chromosome X STR Decaplex in deficiency paternity cases*. Genetics and molecular biology. 36 (4): 507 – 510
- [23]. Fundación de Antropología Forense de Guatemala. 2014. Recopilado el 16 de febrero 2015, de <http://wayback.archiveit.org/1068/20140102210559/http://www.fafg.org/paginas/fafg.htm>
- [24]. GenaGen. 2014. *¿Qué es la herencia mitocondrial?*. Recopilado el 18 de enero 2016, de: <http://www.genagen.es/area-pacientes/informacion-genetica-y-enfermedades-hereditarias/conceptos-genetica/tipos-de-herencia-genetica/herencia-mitocondrial/>
- [25]. Gusmao, L. y A. Carracedo. 2003. *Y Chromosome-Specific STRs*. Profiles in DNA. Marzo 2003.
- [26]. Hill, R. 2008. *Autosomal DNA Test for Genealogy. DNA Testing Adviser: The independent Guide to DNA Testing*. Recopilado el 16 de febrero 2015, de <http://www.dna-testing-adviser.com/Autosomal-DNA-Testing.html>
- [27]. Holland, M. y T. Parsons. 1999. *Mitochondrial DNA Sequence Analysis – Validation and Use for forensic Casework*. Central Police University Press. 1042-7201/11-01-99/21.
- [28]. Honda, K.; L. Roewer; P. Kniff. 1999. *Male DNA typing from 25-year-old vaginal swabs Using Y Chromosomal STR Polymorphisms in a Retrieval Request Case*. J. Forensic Sci. 44(4): 868-872
- [29]. Kloosterman, A.; B. Budowle; P. Daselaar. 1993. *PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus*. Int J Leg Med. 105: 257-264.
- [30]. Köchl, S.; H. Niederstätter; W. Parson. 2005. *DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR*. Methods in Molecular Biology: forensic DNA typing protocols. 297: 13-29.
- [31]. Laboratorio de genética forense. Fundación de Antropología Forense de Guatemala. 2014. Recopilado el 16 de febrero 2015, de <http://wayback.archive-it.org/1068/20140623190851/http://www.fafg.org/paginas/adn.htm>

- [32]. Lazos, Rubén e Ignacio Hernández. 2004. *La validación de métodos: un enfoque práctico*. Simposio de Metrología. Recopilado el 18 de enero 2016, de: <https://www.cenam.mx/simposio2004/memorias/TA-090.pdf>
- [33]. Leclair, Benoit; Chantal Frégeau; Kathy Bowen; Ron Fourney. 2004. *Systematic analysis of stutter percentages and allele peak height and peak area ratios at heterozygous STR loci for Forensic Casework and Database Samples*. J Forensic Sci 49 (5): 1-13
- [34]. Melton, T. 2009. *Mitochondrial DNA Examination of cold Case Crime*. Forensic Magazine: on the Scene and In the lab.
- [35]. Melton, T. y K. Nelson. 2001. *Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Two Years of Commercial Casework Experience in the United States*. Croatian medical Journal. 42(3) 298-303
- [36]. Petersen, J. Y A. Mohammad. 2001. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Humana Press.
- [37]. Pierce, Benjamín. 2009. *Genética: un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana. 832 pp.
- [38]. Pinto, N.; L. Gusmao; T. Egeland; A. Amorim. 2013. *Paternity exclusion power: comparative behaviour of autosomal and X-chromosomal markers in standard and deficient cases with inbreeding*. Forensic Science International. 7: 290-295.
- [39]. PREMIER Biosoft: *Multiplex PCR* (s.f.). Recopilado el 19 de febrero 2015, de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html
- [40]. Qiangsun, Z.; S. Qing; F. Lei; L. Junlin; L. Jun. 2001. *Relationship between HUMARA STR polymorphism and atherosclerosis susceptibility*. Journal of the Fourth Military Medical University. 22(17): 1590-1593.
- [41]. Qiagen. 2013. *Investigator Argus x-12 Handbook. For multiplex amplification of 12 STR loci of the X chromosome, plus Amelogenin*. Sample & Assay Technologies.
- [42]. Rohland, N. y M. Hofreiter. 2007. *Ancient DNA extraction from bones and teeth*. Nature Protocols 2(7): 1756 – 1762.
- [43]. Sherif, H. Y F. Ahmed. 2012. *Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 102-112.
- [44]. Shewale, J.; H. Nasir; E. Scheneida; A. Gross; B. Budowle; S. Sinha. 2004. *Y-Chromosome STR System, Y-PLEX 12, for Forensic Casework: Development and Validation*. J. Forensic Sci. 49(6): 1-13
- [45]. SWGDAM. 2012. *Validation guidelines for DNA analysis methods*. SWGDAM Validation Guidelines.
- [46]. Sykes, B. y C. Irven. 2000. *Surnames and the Y Chromosome*. Am. J. Hum. Genet. 66: 1417-1419.
- [47]. Szibor, R. 2007. *X-chromosomal markers: past, present and future*. Forensic Science International Genetics 1. 93-99.
- [48]. Szibor, R.; J. Edelmann; S. Hering. (s.f.) *Kits including X-linked STR markers*. Recopilado el 17 de febrero 2015, de <http://www.chrx-str.org>

- [49]. Tillman, A. 2010. *Populations and Statistics in Forensic*. Linköping University Medical Dissertations no. 11751.
- [50]. USC Shoah. 2014. *Delegation from Guatemala's FAFG visits USC Shoah Foundation*. Recopilado el 16 de febrero 2015. En: <https://sfi.usc.edu/news/2014/09/6558-delegation-guatemala%E2%80%99s-fafg-visits-usc-shoah-foundation>

XI. CONTACTOS

Estudiante: Andrea Vanessa Gómez Barillas

Teléfono: 55018421

Correo electrónico: gomezandreavanessa@gmail.com

Asesor: Marco García King

Teléfono: 40643121

Correo electrónico: marcodgk@gmail.com

XII. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado utilizado para la toma de las muestras de referencia utilizadas para la validación.

Fundación de Antropología Forense Guatemala CONFIDENTIAL - Not to be copied or distributed without authorization.			
ISO5.8.3.1_A	Informed consent	Effective date: 13/02/2014	Revision: A
			Page 1 of 2



Consentimiento informado para toma de muestra biológica

1.0 OBJETIVO

Obtener la muestra biológica del personal o visitantes de la FAFG para su almacenamiento, utilización en la obtención del perfil genético, ampliación de la base de datos poblacional, entrenamiento y/o capacitación del personal, validación de técnicas de laboratorio, ensayos de control de calidad, eliminación de la posible contaminación por ingresar a las instalaciones del laboratorio y/o contacto con las muestras biológicas procesadas y publicaciones científicas.

2.0 PRINCIPIO

Las muestras de referencia de ADN son recolectadas de donadores individuales principalmente a partir de hisopados bucales (mejillas) para la obtención de células epiteliales. Otro tipo de muestras incluyen sangre, cabellos, semen, orina, goma de mascar, cigarrillos, entre otros. A excepción de la toma de muestra de sangre, el método utilizado es no invasivo, es decir que no causa dolor.

3.0 ANTECEDENTES

El genoma contiene regiones denominadas repeticiones en tándem cortas ("STR", por sus siglas en inglés), que varían ampliamente de una persona a otra. Luego de analizar 15 regiones hipervariables del ADN, que están situadas en los cromosomas autosómicos (no sexuales), el perfil resultante puede utilizarse para verificar las relaciones familiares con un alto grado de fiabilidad. Cada persona hereda una combinación única de marcadores genéticos de los padres biológicos; por tanto el perfil de ADN puede servir como un registro biológico de identidad permanente. (Nota: Los gemelos idénticos tendrán el mismo perfil de ADN). De estas secuencias no se puede deducir si la persona que dona la muestra tiene predisposición a sufrir una enfermedad o presenta una determinada peculiaridad física. Tampoco diagnostica enfermedades infecciosas.

4.0 MATERIALES^A

Toma de muestra de saliva:

- Guantes (látex o nitrilo)
- Hisopos estériles / Hisopo FTA
- Marcador permanente
- Tarjetas FTA (si aplica)
- Sobres de papel
- Cinta adhesiva transparente
- Tubos de polipropileno 50 mL (si aplica)
- Lapicero

Toma de muestra de sangre:

- Lanceta
- Toallitas con alcohol
- Bote de descarte

5.0 PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA DE HISOPADOS BUCALES

- 5.1 En el caso de la muestra de hisopado bucal de ser posible enjuagarse la boca con agua previo a la toma de muestra para evitar contaminación por residuos de alimentos.
- 5.2 Se colocará una tarjeta FTA en una superficie plana y seca (Si aplica).
- 5.3 Se rotula la tarjeta FTA con un número de identificación único (Si aplica).
- 5.4 Se removerá el/los hisopo(s) del empaque.
- 5.5 Se introducirá el/los hisopo(s) en la boca frotando de arriba hacia abajo cada una de las mejillas por 30 segundos, de ser necesario se humedecerá el hisopo en las encillas y debajo de la lengua.
- 5.6 Se removerá el hisopo de la boca.
- 5.7 Se levantará con cuidado la tarjeta FTA y se presionará la esponja en la tarjeta FTA (Si aplica).
- 5.8 Se almacenará la tarjeta FTA y el hisopo en un sobre y se sellará, colocando las iniciales de la persona encargada de tomar la muestra y la fecha sobre la cinta adhesiva
- 5.9 El sobre se identificara con las iniciales del donante y su nombre

ISO5.8.3.1_A_Informed Consent

Printed copies of this document could be out of date and should be considered uncontrolled.

Fundación de Antropología Forense Guatemala

CONFIDENTIAL - Not to be copied or distributed without authorization.

ISO5.8.3.1_A | Informed consent | Effective date: 13/02/2014 | Revision: A | Page 2 of 2



NOTA. Para muestras de sangre se utiliza una gota de sangre obtenida del dedo del participante por punción capilar con una lanceta desechable y ésta se coloca en una tarjeta FTA debidamente identificada y sellada, este procedimiento puede ocasionar una ligera molestia y/o dolor. Para otro tipo de muestra el participante coloca la muestra en un recipiente debidamente identificado y la entrega al personal del laboratorio de Genética Forense.

6.0 CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida (perfiles genéticos) se manejará de forma confidencial y en caso quede muestra disponible luego del análisis, ésta permanecerá resguardada en el almacén de evidencia del Laboratorio de Genética Forense con acceso restringido. La información será manejada únicamente por personal del Laboratorio de Genética Forense para los siguientes fines: Ampliación de la base de datos de poblacional, entrenamiento y/o capacitación del personal, validación de técnicas de laboratorio, ensayos de control de calidad, eliminación de posibles fuentes de contaminación y publicaciones científicas. En el caso en que el laboratorio de Genética Forense de la FAFG utilice información para fines de publicación científica, los perfiles genéticos se manejarán sin revelar la identidad del participante.

7.0 RETIRO

La participación es voluntaria, por lo que si no desea participar o desea retirarse del estudio en cualquier momento puede realizarlo sin que afecte su relación en la FAFG.

8.0 COSTO

Participar en la toma de muestra no tiene ningún costo y los participantes tampoco serán remunerados.

9.0 DUDAS

Cualquier duda respecto a la toma de muestra se puede comunicar con el personal del Laboratorio de Genética Forense.

10.0 TIPO DE MUESTRA

En el listado a continuación marcaré el tipo de muestra que acepto donar voluntariamente:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Hisopado bucal | <input type="checkbox"/> Orina |
| <input type="checkbox"/> Sangre | <input type="checkbox"/> Cabellos |
| <input type="checkbox"/> Semen | <input type="checkbox"/> Otros: _____ |

11. ACEPTACIÓN

La aceptación indica que recibirá una copia del consentimiento informado. Su firma debajo indica que está enterado y comprende todo lo indicado en este consentimiento, acepta participar en la toma de muestra y en la utilización de la misma y de la información obtenida para los fines indicados arriba.

NOTA: Reconozco que comprendo la información proporcionada, que deseo donar voluntariamente la muestra y que sea almacenada por el tiempo que el Laboratorio de ADN considere necesario para fines científicos y que la información será confidencial. Una vez aceptada mi participación, me comprometo a cooperar a que la investigación se desarrolle adecuadamente y acepto que si el personal del Laboratorio de Genética Forense así lo requiere, se tome nuevamente la muestra. Para constancia de lo anterior plasmó mi firma.

Nombre y firma de Participante: _____

Nombre y firma de Encargado _____

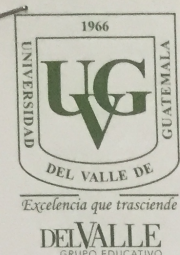
Fecha _____

FIN

ISO5.8.3.1_A_Informed Consent

Printed copies of this document could be out of date and should be considered uncontrolled.

ANEXO 2. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala para la realización del proyecto



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 calle 15-79, Zona 15 V.H.III
Apartado Postal No. 82,01901
Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX 2369 0791 al 95
Tels: 2364 0336 al 40
2364 0492 al 97
FAX (502) 2364 0212
www.uvg.edu.gt

COMITÉ DE ETICA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

No. protocolo	BM-008-Febrero 2015
---------------	---------------------

A: Lic. Marco David García King, Investigador Principal
Andrea Vanessa Gómez Barillas, Co-Investigador Principal

DE: Dr. Elfego Rolando López García
Presidente
Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades

FECHA: 30 de abril de 2015.

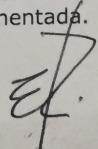

ASUNTO: Trabajo de Investigación: **Validación y Optimización de un Kit Comercial para la Amplificación de 12 STR del Cromosoma X en el laboratorio acreditado ISO 17025 de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) en la Ciudad de Guatemala**

VEREDICTO: APROBADO

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG ha revisado y aprobado el protocolo arriba indicado. Se le recuerda que el comité debe revisar y aprobar todos protocolos de investigación que utilicen la experimentación biomédica en seres humanos, en intervalos apropiados y de acuerdo al nivel de riesgo, por lo menos una vez al año. Si el proyecto dura más de un año, es responsabilidad del investigador, enviar al comité el protocolo de investigación para revisión y solicitud de aprobación de continuación del estudio.

Archive esta notificación como prueba de la aprobación. Para evitar atrasos en la aprobación de su investigación y la posible suspensión del estudio, por favor envíe su solicitud de continuación, por lo menos seis semanas antes de cumplirse seis meses después de haber sido autorizado por este comité.

Cualquier problema o evento serio relacionado con el estudio, deberá ser notificado inmediatamente al Comité. Cualquier modificación al protocolo debe ser enviada a este Comité, para su aprobación antes de ser implementada.



Excellencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

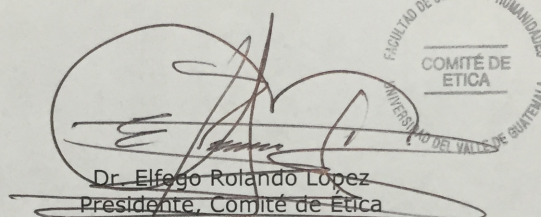
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 calle 15-79, Zona 15 V.H.III
Apartado Postal No. 82,01901
Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX 2369 0791 al 95
Tels: 2364 0336 al 40
2364 0492 al 97
FAX (502) 2364 0212
www.uvg.edu.gt

2/2 Andrea Vanessa Gómez B.

Si tiene alguna duda o pregunta, por favor contactar a la Lda. Lucía Nitsch Velásquez, Secretaria del Comité de Ética, al teléfono 2368 8339, extensión 301 y/o 385 o al correo electrónico lnitsch@uvg.edu.gt.



Dr. Efraim Rolando López
Presidente, Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala

ERLG/alo
c.c. Dirección Departamento
Expediente Comité Ética
archivo

ANEXO 3: Alelos esperados, alelos obtenidos y artefactos observados para las muestras de referencia, esqueléticas y de evidencia a diferentes concentraciones y condiciones de inyección

Condiciones de inyección	Dilución	Tipo de Muestra	Alelos esperados	Alelos obtenidos	Drop Outs	Off-Scale	Pull-up	Stochastic effects	Stutters	A-peaks	Off-ladder	Shoulders	Artefactos	% Dropout	% Off-Scale	% Pull-up	% Stochastic effects	% Stutters	% A-peaks	% Off-ladder	% Shoulders	% Artefactos
3 kV 10 s	1	Sangre	37	48	0	0	0	0	0	3	2	6	0	0%	0%	0%	0%	0%	8%	5%	16%	30%
3 kV 10 s	1:2	Sangre	37	40	1	0	2	0	0	0	2	0	0	3%	0%	5%	0%	0%	0%	5%	0%	14%
3 kV 10 s	1:4	Sangre	37	38	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	3%
3 kV 10 s	1:8	Sangre	37	27	10	0	0	0	0	0	0	0	0	27%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	27%
3 kV 10 s	1:16	Sangre	37	33	6	0	0	0	0	0	2	0	0	16%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	22%
3 kV 10 s	1:32	Sangre	37	25	14	0	0	0	0	0	2	0	0	38%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	43%
3 kV 10 s	1:64	Sangre	37	2	35	0	0	0	0	0	0	0	0	95%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	95%
3 kV 15 s	1	Sangre	37	45	0	0	0	0	0	3	2	3	0	0%	0%	0%	0%	0%	8%	5%	8%	22%
3 kV 15 s	1:2	Sangre	37	39	1	0	1	0	0	0	2	0	0	3%	0%	3%	0%	0%	0%	5%	0%	11%
3 kV 15 s	1:4	Sangre	37	38	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	3%
3 kV 15 s	1:8	Sangre	37	27	10	0	0	0	0	0	0	0	0	27%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	27%
3 kV 15 s	1:16	Sangre	37	33	6	0	0	0	0	0	2	0	0	16%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	22%
3 kV 15 s	1:32	Sangre	37	27	14	0	0	0	0	0	4	0	0	38%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%	49%
3 kV 15 s	1:64	Sangre	37	2	35	0	0	0	0	0	0	0	0	95%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	95%
3 kV 20 s	1	Sangre	37	46	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0%	0%	0%	0%	0%	8%	8%	8%	24%
3 kV 20 s	1:2	Sangre	37	43	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0%	0%	5%	0%	0%	0%	11%	0%	16%
3 kV 20 s	1:4	Sangre	37	41	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0%	0%	5%	0%	0%	0%	5%	0%	11%
3 kV 20 s	1:8	Sangre	37	38	2	0	1	0	0	0	2	0	0	5%	0%	3%	0%	0%	0%	5%	0%	14%
3 kV 20 s	1:16	Sangre	37	37	4	0	0	0	0	0	4	0	0	11%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%	22%
3 kV 20 s	1:32	Sangre	37	27	14	0	0	0	0	0	4	0	0	38%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%	49%
3 kV 20 s	1:64	Sangre	37	3	37	0	0	0	0	0	3	0	0	100%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	0%	108%

Condiciones de inyección	Dilución	Tipo de Muestra	Alelos esperados	Alelos obtenidos	Drop Outs	Off-Scale	Pull-up	Stochastic effects	Stutters	A-peaks	Off-ladder	Shoulders	Artefactos	% Dropout	% Off-Scale	% Pull-up	% Stochastic effects	% Stutters	% A-peaks	% Off-ladder	% Shoulders	% Artefactos
3 kV 10 s	12.5 pg/ul	Chelex®	37	18	21	0	0	0	0	0	2	0	0	57%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	62%
3 kV 10 s	6.25 pg/ul	Chelex®	37	10	29	0	0	0	0	0	2	0	0	78%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	84%
3 kV 15 s	100 pg/ul	Chelex®	37	40	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	5%	8%
3 kV 15 s	75 pg/ul	Chelex®	37	41	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0%	0%	3%	0%	0%	0%	3%	5%	11%
3 kV 15 s	50 pg/ul	Chelex®	37	38	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	3%
3 kV 15 s	25 pg/ul	Chelex®	37	35	5	0	0	0	0	0	2	1	0	14%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	3%	22%
3 kV 15 s	12.5 pg/ul	Chelex®	37	26	14	0	0	0	0	0	2	1	0	38%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	3%	46%
3 kV 15 s	6.25 pg/ul	Chelex®	37	19	20	0	0	0	0	0	4	0	0	54%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%	65%
3 kV 20 s	100 pg/ul	Chelex®	37	44	0	0	3	0	0	2	2	0	0	0%	0%	8%	0%	0%	5%	5%	0%	19%
3 kV 20 s	75 pg/ul	Chelex®	37	42	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0%	0%	5%	0%	0%	5%	3%	0%	14%
3 kV 20 s	50 pg/ul	Chelex®	37	42	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0%	0%	0%	0%	0%	5%	8%	0%	14%
3 kV 20 s	25 pg/ul	Chelex®	37	39	2	0	0	0	0	2	2	0	0	5%	0%	0%	0%	0%	5%	5%	0%	16%
3 kV 20 s	12.5 pg/ul	Chelex®	37	33	8	0	0	0	0	1	3	0	0	22%	0%	0%	0%	0%	3%	8%	0%	32%
3 kV 20 s	6.25 pg/ul	Chelex®	37	28	15	0	1	0	0	1	4	0	0	41%	0%	3%	0%	0%	3%	11%	0%	57%
3 kV 10 s	100 pg/ul	Evidencia	37	78	0	0	3	0	0	2	1	0	0	0%	0%	8%	0%	0%	5%	3%	0%	16%
3 kV 10 s	75 pg/ul	Evidencia	37	74	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0%	0%	0%	0%	0%	3%	3%	0%	5%
3 kV 10 s	50 pg/ul	Evidencia	37	74	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0%	0%	3%	0%	0%	0%	3%	0%	5%
3 kV 10 s	25 pg/ul	Evidencia	37	75	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0%	0%	5%	3%	0%	0%	3%	0%	11%
3 kV 10 s	12.5 pg/ul	Evidencia	28	74	0	0	1	3	0	0	3	0	0	0%	0%	4%	11%	0%	0%	11%	0%	25%
3 kV 10 s	6.25 pg/ul	Evidencia	28	56	12	0	0	6	0	0	2	0	0	43%	0%	0%	21%	0%	0%	7%	0%	71%
3 kV 15 s	100 pg/ul	Evidencia	37	78	0	0	3	0	0	2	1	0	0	0%	0%	8%	0%	0%	5%	3%	0%	16%
3 kV 15 s	75 pg/ul	Evidencia	37	74	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0%	0%	0%	0%	0%	3%	3%	0%	5%
3 kV 15 s	50 pg/ul	Evidencia	37	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3 kV 15 s	25 pg/ul	Evidencia	37	72	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0%	0%	3%	5%	0%	0%	3%	0%	11%
3 kV 15 s	12.5 pg/ul	Evidencia	46	73	0	0	2	3	0	0	2	0	0	0%	0%	4%	7%	0%	0%	4%	0%	15%
3 kV 15 s	6.25 pg/ul	Evidencia	46	64	8	0	0	3	0	0	3	0	0	17%	0%	0%	7%	0%	0%	7%	0%	30%
3 kV 20 s	100 pg/ul	Evidencia	37	77	0	3	0	0	0	1	1	0	0	0%	8%	0%	0%	0%	3%	3%	0%	14%
3 kV 20 s	75 pg/ul	Evidencia	37	76	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0%	5%	0%	0%	0%	3%	3%	0%	11%

ANEXO 4: Balance de heterocigotos para muestras referenciales, esqueléticas y de evidencia a diferentes concentraciones y condiciones de inyección

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10103	226	198	0.88
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS7132	439	397	0.90
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10148	445	397	0.89
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10074	148	120	0.81
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10101	87	84	0.97
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10135	458	386	0.84
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS7423	357	366	0.98
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10146	570	346	0.61
3 kV 10 s	7	Blood1	DXS10079	932	856	0.92
3 kV 10 s	7	Blood1	HPRTB	583	528	0.91
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10103	75	87	0.86
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS7132	159	169	0.94
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10148	130	141	0.92
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10074	59	76	0.78
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10101	95	107	0.89
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10135	88	103	0.85
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS7423	30	35	0.86
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10146	175	228	0.77
3 kV 10 s	6	Blood1	DXS10079	290	303	0.96
3 kV 10 s	6	Blood1	HPRTB	213	237	0.90
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10103	73	65	0.89
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS7132	86	86	1.00
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10148	74	66	0.89
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10074	66	58	0.88
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10101	73	78	0.94
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10135	81	73	0.90
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS7423	46	42	0.91
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10146	129	105	0.81
3 kV 10 s	5	Blood1	DXS10079	143	133	0.93
3 kV 10 s	5	Blood1	HPRTB	78	80	0.98
3 kV 10 s	4	Blood1	DXS10148	33	34	0.97
3 kV 10 s	4	Blood1	DXS10101	33	23	0.70
3 kV 10 s	4	Blood1	DXS10146	56	42	0.75
3 kV 10 s	4	Blood1	DXS10079	72	70	0.97
3 kV 10 s	4	Blood1	HPRTB	30	30	1.00
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10103	48	46	0.96
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS7132	53	48	0.91
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10148	75	78	0.96
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10074	56	48	0.86
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10101	79	74	0.94
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10135	53	55	0.96

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS7423	43	40	0.93
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10146	115	97	0.84
3 kV 10 s	3	Blood1	DXS10079	154	138	0.90
3 kV 10 s	3	Blood1	HPRTB	70	59	0.84
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10103	53	32	0.60
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS7132	38	39	0.97
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10148	41	34	0.83
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10074	40	42	0.95
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10101	88	58	0.66
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10135	34	29	0.85
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS7423	33	32	0.97
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10146	76	47	0.62
3 kV 10 s	2	Blood1	DXS10079	74	80	0.93
3 kV 10 s	2	Blood1	HPRTB	36	28	0.78
3 kV 10 s	1	Blood1	DXS10074	48	48	1.00
3 kV 10 s	1	Blood1	DXS7423	51	51	1.00
3 kV 10 s	7	Blood2	AM	215	195	0.91
3 kV 10 s	6	Blood2	AM	65	62	0.95
3 kV 10 s	5	Blood2	AM	65	65	1.00
3 kV 10 s	4	Blood2	AM	57	61	0.93
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10103	341	302	0.89
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS7132	660	603	0.91
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10148	656	589	0.90
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10074	229	185	0.81
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10101	135	128	0.95
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10135	671	575	0.86
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS7423	530	550	0.96
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10146	816	489	0.60
3 kV 15 s	7	Blood1	DXS10079	1381	1241	0.90
3 kV 15 s	7	Blood1	HPRTB	866	791	0.91
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10103	126	110	0.87
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS7132	250	236	0.94
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10148	205	201	0.98
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10074	115	88	0.77
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10101	156	140	0.90
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10135	149	129	0.87
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS7423	44	54	0.81
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10146	329	246	0.75
3 kV 15 s	6	Blood1	DXS10079	440	420	0.95
3 kV 15 s	6	Blood1	HPRTB	348	317	0.91
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10103	111	102	0.92
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS7132	136	133	0.98
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10148	115	105	0.91
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10074	107	93	0.87

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10101	115	122	0.94
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10135	121	115	0.95
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS7423	73	66	0.90
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10146	196	163	0.83
3 kV 15 s	5	Blood1	DXS10079	219	202	0.92
3 kV 15 s	5	Blood1	HPRTB	118	124	0.95
3 kV 15 s	4	Blood1	DXS10148	47	49	0.96
3 kV 15 s	4	Blood1	DXS10101	49	35	0.71
3 kV 15 s	4	Blood1	DXS10146	88	64	0.73
3 kV 15 s	4	Blood1	DXS10079	112	101	0.90
3 kV 15 s	4	Blood1	HPRTB	46	44	0.96
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10103	71	67	0.94
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS7132	76	74	0.97
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10148	111	115	0.97
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10074	84	68	0.81
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10101	115	109	0.95
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10135	77	79	0.97
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS7423	71	62	0.87
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10146	174	141	0.81
3 kV 15 s	3	Blood1	DXS10079	218	202	0.93
3 kV 15 s	3	Blood1	HPRTB	101	88	0.87
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10103	84	48	0.57
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS7132	53	55	0.96
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10148	60	50	0.83
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10074	51	62	0.82
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10101	125	85	0.68
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10135	48	44	0.92
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS7423	51	45	0.88
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10146	115	73	0.63
3 kV 15 s	2	Blood1	DXS10079	101	116	0.87
3 kV 15 s	2	Blood1	HPRTB	55	41	0.75
3 kV 15 s	1	Blood1	DXS10074	74	74	1.00
3 kV 15 s	1	Blood1	DXS7423	81	81	1.00
3 kV 15 s	7	Blood2	AM	316	286	0.91
3 kV 15 s	6	Blood2	AM	98	94	0.96
3 kV 15 s	5	Blood2	AM	89	80	0.90
3 kV 15 s	4	Blood2	AM	85	89	0.96
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10103	459	408	0.89
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS7132	888	809	0.91
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10148	868	775	0.89
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10074	307	248	0.81
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10101	181	167	0.92
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10135	897	757	0.84
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS7423	706	734	0.96

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10146	1079	639	0.59
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10079	1796	1612	0.90
3 kV 20 s	7	Blood1	HPRTB	1154	1063	0.92
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10103	171	148	0.87
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS7132	329	306	0.93
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10148	270	254	0.94
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10074	153	121	0.79
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10101	206	185	0.90
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10135	195	169	0.87
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS7423	58	64	0.91
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10146	430	309	0.72
3 kV 20 s	6	Blood1	DXS10079	562	532	0.95
3 kV 20 s	6	Blood1	HPRTB	452	410	0.91
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10103	147	135	0.92
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS7132	173	172	0.99
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10148	149	132	0.89
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10074	139	120	0.86
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10101	144	160	0.90
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10135	154	144	0.94
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS7423	92	88	0.96
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10146	251	203	0.81
3 kV 20 s	5	Blood1	DXS10079	279	254	0.91
3 kV 20 s	5	Blood1	HPRTB	151	163	0.93
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10103	33	33	1.00
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS7132	35	39	0.90
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10148	63	68	0.93
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10074	30	30	1.00
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10101	63	44	0.70
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10135	34	31	0.91
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS7423	31	35	0.89
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10146	112	83	0.74
3 kV 20 s	4	Blood1	DXS10079	141	132	0.94
3 kV 20 s	4	Blood1	HPRTB	59	60	0.98
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10103	96	89	0.93
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS7132	103	97	0.94
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10148	144	150	0.96
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10074	109	89	0.82
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10101	148	142	0.96
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10135	97	105	0.92
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS7423	89	82	0.92
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10146	224	187	0.83
3 kV 20 s	3	Blood1	DXS10079	289	260	0.90
3 kV 20 s	3	Blood1	HPRTB	137	115	0.84
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10103	113	66	0.58

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS7132	75	74	0.99
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10148	78	68	0.87
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10074	82	80	0.98
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10101	162	109	0.67
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10135	66	55	0.83
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS7423	60	56	0.93
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10146	152	94	0.62
3 kV 20 s	2	Blood1	DXS10079	135	146	0.92
3 kV 20 s	2	Blood1	HPRTB	68	55	0.81
3 kV 20 s	1	Blood1	DXS10074	102	102	1.00
3 kV 20 s	1	Blood1	DXS7423	108	108	1.00
3 kV 20 s	7	Blood1	DXS10146	34	34	1.00
3 kV 20 s	7	Blood2	AM	420	375	0.89
3 kV 20 s	6	Blood2	AM	133	130	0.98
3 kV 20 s	5	Blood2	AM	117	106	0.91
3 kV 20 s	4	Blood2	AM	116	118	0.98
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10103	190	191	0.99
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS7132	215	183	0.85
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10148	90	82	0.91
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10074	137	119	0.87
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10101	154	142	0.92
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10135	122	104	0.85
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS7423	67	69	0.97
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10146	165	141	0.85
3 kV 10 s	7	FTA1	DXS10079	154	155	0.99
3 kV 10 s	7	FTA1	HPRTB	118	123	0.96
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10103	102	88	0.86
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS7132	107	104	0.97
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10148	61	55	0.90
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10074	73	63	0.86
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10101	93	83	0.89
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10135	74	68	0.92
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS7423	58	63	0.92
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10146	106	99	0.93
3 kV 10 s	6	FTA1	DXS10079	125	117	0.94
3 kV 10 s	6	FTA1	HPRTB	67	68	0.99
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10103	42	45	0.93
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS7132	39	39	1.00
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10148	39	35	0.90
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10074	31	32	0.97
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10101	49	41	0.84
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10135	27	32	0.84
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS7423	27	37	0.73
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10146	71	74	0.96

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	5	FTA1	DXS10079	91	76	0.84
3 kV 10 s	5	FTA1	HPRTB	38	40	0.95
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10103	20	20	1.00
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS7132	24	20	0.83
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10074	22	22	1.00
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10101	26	32	0.81
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10135	24	21	0.88
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS7423	21	21	1.00
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10146	27	26	0.96
3 kV 10 s	4	FTA1	DXS10079	33	22	0.67
3 kV 10 s	3	FTA1	DXS10101	23	27	0.85
3 kV 10 s	3	FTA1	DXS10146	22	22	1.00
3 kV 10 s	3	FTA1	DXS10079	21	24	0.88
3 kV 10 s	7	FTA2	AM	28	31	0.90
3 kV 10 s	6	FTA2	AM	24	22	0.92
3 kV 10 s	4	FTA2	AM	55	45	0.82
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10103	299	295	0.99
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS7132	349	302	0.87
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10148	131	121	0.92
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10074	209	184	0.88
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10101	241	225	0.93
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10135	188	164	0.87
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS7423	102	110	0.93
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10146	257	213	0.83
3 kV 15 s	7	FTA1	DXS10079	247	246	1.00
3 kV 15 s	7	FTA1	HPRTB	191	201	0.95
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10103	169	146	0.86
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS7132	178	181	0.98
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10148	97	88	0.91
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10074	118	106	0.90
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10101	154	138	0.90
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10135	117	110	0.94
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS7423	94	92	0.98
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10146	179	154	0.86
3 kV 15 s	6	FTA1	DXS10079	208	194	0.93
3 kV 15 s	6	FTA1	HPRTB	116	116	1.00
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10103	76	76	1.00
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS7132	71	72	0.99
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10148	59	54	0.92
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10074	50	53	0.94
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10101	83	68	0.82
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10135	49	53	0.92
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS7423	44	55	0.80
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10146	122	123	0.99

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	5	FTA1	DXS10079	162	128	0.79
3 kV 15 s	5	FTA1	HPRTB	68	70	0.97
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10103	38	35	0.92
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS7132	45	36	0.80
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10148	21	21	1.00
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10074	26	33	0.79
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10101	48	54	0.89
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10135	37	31	0.84
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS7423	28	32	0.88
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10146	46	41	0.89
3 kV 15 s	4	FTA1	DXS10079	63	38	0.60
3 kV 15 s	4	FTA1	HPRTB	25	27	0.93
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10103	26	26	1.00
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS7132	35	24	0.69
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10148	22	22	1.00
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10074	28	28	1.00
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10101	37	41	0.90
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10135	25	25	1.00
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10146	36	31	0.86
3 kV 15 s	3	FTA1	DXS10079	33	39	0.85
3 kV 15 s	3	FTA1	HPRTB	25	24	0.96
3 kV 15 s	2	FTA1	DXS10146	20	20	1.00
3 kV 15 s	7	FTA2	AM	45	48	0.94
3 kV 15 s	6	FTA2	AM	50	48	0.96
3 kV 15 s	5	FTA2	AM	25	25	1.00
3 kV 15 s	4	FTA2	AM	90	80	0.89
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10103	409	400	0.98
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS7132	467	406	0.87
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10148	175	161	0.92
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10074	288	249	0.86
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10101	319	297	0.93
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10135	246	216	0.88
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS7423	136	147	0.93
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10146	348	283	0.81
3 kV 20 s	7	FTA1	DXS10079	323	324	1.00
3 kV 20 s	7	FTA1	HPRTB	255	264	0.97
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10103	228	201	0.88
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS7132	238	239	1.00
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10148	125	114	0.91
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10074	163	142	0.87
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10101	201	188	0.94
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10135	150	144	0.96
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS7423	124	128	0.97
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10146	239	206	0.86

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	6	FTA1	DXS10079	273	248	0.91
3 kV 20 s	6	FTA1	HPRTB	150	154	0.97
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10103	100	101	0.99
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS7132	93	95	0.98
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10148	79	73	0.92
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10074	63	69	0.91
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10101	110	89	0.81
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10135	62	69	0.90
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS7423	58	79	0.73
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10146	162	163	0.99
3 kV 20 s	5	FTA1	DXS10079	214	167	0.78
3 kV 20 s	5	FTA1	HPRTB	91	90	0.99
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10103	52	47	0.90
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS7132	63	52	0.83
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10148	27	29	0.93
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10074	36	48	0.75
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10101	66	77	0.86
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10135	50	42	0.84
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS7423	38	40	0.95
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10146	68	60	0.88
3 kV 20 s	4	FTA1	DXS10079	89	55	0.62
3 kV 20 s	4	FTA1	HPRTB	35	39	0.90
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10103	24	36	0.67
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS7132	47	33	0.70
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10148	26	23	0.88
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10074	40	23	0.58
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10101	50	56	0.89
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10135	32	30	0.94
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS7423	20	20	1.00
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10146	52	41	0.79
3 kV 20 s	3	FTA1	DXS10079	49	53	0.92
3 kV 20 s	3	FTA1	HPRTB	35	34	0.97
3 kV 20 s	2	FTA1	DXS10101	20	20	1.00
3 kV 20 s	2	FTA1	DXS10146	25	25	1.00
3 kV 20 s	2	FTA1	DXS10079	20	26	0.77
3 kV 20 s	7	FTA2	AM	61	70	0.87
3 kV 20 s	6	FTA2	AM	64	67	0.96
3 kV 20 s	5	FTA2	AM	28	26	0.93
3 kV 20 s	5	FTA2	AM	114	109	0.96
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10103	208	208	1.00
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS7132	182	161	0.88
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10148	70	63	0.90
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10074	72	70	0.97
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10101	53	41	0.77

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10135	99	86	0.87
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS7423	108	116	0.93
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10146	127	89	0.70
3 kV 10 s	100	Chelex®1	DXS10079	107	107	1.00
3 kV 10 s	100	Chelex®1	HPRTB	90	86	0.96
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10103	163	140	0.86
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS7132	129	131	0.98
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10148	57	48	0.84
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10074	63	47	0.75
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10101	40	37	0.93
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10135	79	70	0.89
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS7423	89	96	0.93
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10146	94	69	0.73
3 kV 10 s	75	Chelex®1	DXS10079	89	83	0.93
3 kV 10 s	75	Chelex®1	HPRTB	74	71	0.96
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10103	113	104	0.92
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS7132	84	90	0.93
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10148	34	31	0.91
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10074	55	43	0.78
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10101	32	31	0.97
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10135	73	56	0.77
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS7423	61	62	0.98
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10146	65	46	0.71
3 kV 10 s	50	Chelex®1	DXS10079	60	79	0.76
3 kV 10 s	50	Chelex®1	HPRTB	47	46	0.98
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10103	66	67	0.99
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS7132	46	31	0.67
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10074	32	34	0.94
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10101	40	32	0.80
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10135	32	31	0.97
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS7423	41	36	0.88
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10146	55	47	0.85
3 kV 10 s	25	Chelex®1	DXS10079	39	43	0.91
3 kV 10 s	25	Chelex®1	HPRTB	30	30	1.00
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS10103	61	57	0.93
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS7132	46	34	0.74
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS10074	42	30	0.71
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS10101	35	35	1.00
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS10135	35	35	1.00
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS7423	34	36	0.94
3 kV 10 s	12.5	Chelex®1	DXS10146	37	35	0.95
3 kV 10 s	6.25	Chelex®1	DXS10103	30	30	1.00
3 kV 10 s	6.25	Chelex®1	DXS10074	33	33	1.00
3 kV 10 s	6.25	Chelex®1	DXS10101	45	33	0.73

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	6.25	Chelex®1	DXS10079	34	34	1.00
3 kV 10 s	100	Chelex®2	AM	596	457	0.77
3 kV 10 s	75	Chelex®2	AM	171	149	0.87
3 kV 10 s	50	Chelex®2	AM	87	81	0.93
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10103	324	326	0.99
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS7132	289	255	0.88
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10148	116	98	0.84
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10074	112	110	0.98
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10101	83	69	0.83
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10135	152	130	0.86
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS7423	169	178	0.95
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10146	195	130	0.67
3 kV 15 s	100	Chelex®1	DXS10079	158	163	0.97
3 kV 15 s	100	Chelex®1	HPRTB	135	133	0.99
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10103	252	218	0.87
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS7132	196	201	0.98
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10148	86	69	0.80
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10074	93	75	0.81
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10101	56	57	0.98
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10135	120	100	0.83
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS7423	136	150	0.91
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10146	138	104	0.75
3 kV 15 s	75	Chelex®1	DXS10079	127	124	0.98
3 kV 15 s	75	Chelex®1	HPRTB	118	110	0.93
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10103	172	159	0.92
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS7132	129	138	0.93
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10148	55	49	0.89
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10074	84	67	0.80
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10101	56	50	0.89
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10135	116	86	0.74
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS7423	97	92	0.95
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10146	99	68	0.69
3 kV 15 s	50	Chelex®1	DXS10079	95	122	0.78
3 kV 15 s	50	Chelex®1	HPRTB	73	71	0.97
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10103	101	97	0.96
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS7132	67	44	0.66
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10148	36	36	1.00
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10074	46	49	0.94
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10101	54	52	0.96
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10135	44	42	0.95
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS7423	61	49	0.80
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10146	72	63	0.88
3 kV 15 s	25	Chelex®1	DXS10079	54	55	0.98
3 kV 15 s	25	Chelex®1	HPRTB	38	43	0.88

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10103	98	87	0.89
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS7132	83	64	0.77
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10148	47	47	1.00
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10074	67	48	0.72
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10101	57	40	0.70
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10135	70	70	1.00
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS7423	49	56	0.88
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10146	60	71	0.85
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	DXS10079	47	46	0.98
3 kV 15 s	12.5	Chelex®1	HPRTB	30	30	1.00
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10103	45	45	1.00
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS7132	34	34	1.00
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10074	44	51	0.86
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10101	62	46	0.74
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10135	40	40	1.00
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS7423	32	31	0.97
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10146	37	37	1.00
3 kV 15 s	6.25	Chelex®1	DXS10079	30	47	0.64
3 kV 15 s	100	Chelex®2	AM	905	708	0.78
3 kV 15 s	75	Chelex®2	AM	265	241	0.91
3 kV 15 s	50	Chelex®2	AM	134	125	0.93
3 kV 15 s	25	Chelex®2	AM	36	33	0.92
3 kV 15 s	12.5	Chelex®2	AM	30	30	1.00
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10103	420	423	0.99
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS7132	368	322	0.88
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10148	151	126	0.83
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10074	146	144	0.99
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10101	110	92	0.84
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10135	198	169	0.85
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS7423	215	230	0.93
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10146	251	172	0.69
3 kV 20 s	100	Chelex®1	DXS10079	207	209	0.99
3 kV 20 s	100	Chelex®1	HPRTB	176	165	0.94
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10103	326	279	0.86
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS7132	254	260	0.98
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10148	109	92	0.84
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10074	127	95	0.75
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10101	76	74	0.97
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10135	154	135	0.88
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS7423	177	199	0.89
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10146	180	139	0.77
3 kV 20 s	75	Chelex®1	DXS10079	166	163	0.98
3 kV 20 s	75	Chelex®1	HPRTB	148	144	0.97
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10103	233	213	0.91

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS7132	171	185	0.92
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10148	69	60	0.87
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10074	116	90	0.78
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10101	76	68	0.89
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10135	146	112	0.77
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS7423	134	119	0.89
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10146	128	93	0.73
3 kV 20 s	50	Chelex®1	DXS10079	122	160	0.76
3 kV 20 s	50	Chelex®1	HPRTB	95	94	0.99
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10103	136	134	0.99
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS7132	88	61	0.69
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10148	48	34	0.71
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10074	63	70	0.90
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10101	75	70	0.93
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10135	62	58	0.94
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS7423	81	68	0.84
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10146	97	87	0.90
3 kV 20 s	25	Chelex®1	DXS10079	73	74	0.99
3 kV 20 s	25	Chelex®1	HPRTB	52	56	0.93
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10103	129	113	0.88
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS7132	109	81	0.74
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10148	34	61	0.56
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10074	86	66	0.77
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10101	75	51	0.68
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10135	92	37	0.40
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS7423	66	69	0.96
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10146	75	90	0.83
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	DXS10079	60	61	0.98
3 kV 20 s	12.5	Chelex®1	HPRTB	39	36	0.92
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10103	63	58	0.92
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS7132	47	47	1.00
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10148	31	31	1.00
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10074	61	69	0.88
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10101	76	62	0.82
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10135	51	51	1.00
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS7423	41	42	0.98
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10146	43	48	0.90
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	DXS10079	44	62	0.71
3 kV 20 s	6.25	Chelex®1	HPRTB	39	44	0.89
3 kV 20 s	100	Chelex®2	AM	1167	919	0.79
3 kV 20 s	75	Chelex®2	AM	352	312	0.89
3 kV 20 s	50	Chelex®2	AM	173	161	0.93
3 kV 20 s	25	Chelex®2	AM	44	43	0.98

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	12.5	Chelex®2	AM	42	37	0.88
3 kV 10 s	100	Evidence1	AM	1743	1714	0.98
				1955	1614	0.83
3 kV 10 s	75	Evidence1	AM			
3 kV 10 s	50	Evidence1	AM	2170	1456	0.67
3 kV 10 s	25	Evidence1	AM	485	560	0.87
3 kV 10 s	12.5	Evidence1	AM	241	286	0.84
3 kV 10 s	6.25	Evidence1	AM	40	40	1.00
3 kV 10 s	100	Evidence2	AM	882	932	0.95
3 kV 10 s	75	Evidence2	AM	758	700	0.92
3 kV 10 s	50	Evidence2	AM	1164	1468	0.79
3 kV 10 s	25	Evidence2	AM	535	482	0.90
3 kV 10 s	12.5	Evidence2	AM	195	154	0.79
3 kV 10 s	6.25	Evidence2	AM	90	51	0.57
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10103	842	852	0.99
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS7132	582	418	0.72
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10148	130	109	0.84
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10074	330	326	0.99
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10101	159	166	0.96
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10135	239	158	0.66
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS7423	448	403	0.90
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10146	340	131	0.39
3 kV 10 s	100	Evidence3	DXS10079	217	193	0.89
3 kV 10 s	100	Evidence3	HPRTB	243	222	0.91
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10103	940	894	0.95
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS7132	598	688	0.87
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10148	156	200	0.78
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10074	375	389	0.96
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10101	272	225	0.83
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10135	313	235	0.75
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS7423	530	445	0.84
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10146	328	255	0.78
3 kV 10 s	75	Evidence3	DXS10079	260	269	0.97
3 kV 10 s	75	Evidence3	HPRTB	313	292	0.93
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10103	874	1130	0.77
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS7132	719	585	0.81
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10148	282	228	0.81
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10074	595	429	0.72
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10101	365	327	0.90
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10135	462	357	0.77
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS7423	666	499	0.75
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10146	535	317	0.59
3 kV 10 s	50	Evidence3	DXS10079	463	362	0.78

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	50	Evidence3	HPRTB	417	347	0.83
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10103	799	861	0.93
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS7132	693	300	0.43
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10148	340	267	0.79
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10074	610	311	0.51
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10101	436	364	0.83
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10135	204	223	0.91
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS7423	447	592	0.76
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10146	632	321	0.51
3 kV 10 s	25	Evidence3	DXS10079	438	202	0.46
3 kV 10 s	25	Evidence3	HPRTB	500	317	0.63
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10103	740	261	0.35
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS7132	558	319	0.57
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10148	112	144	0.78
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10074	214	332	0.64
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10101	333	340	0.98
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10135	167	210	0.80
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS7423	439	289	0.66
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10146	220	246	0.89
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	DXS10079	191	156	0.82
3 kV 10 s	12.5	Evidence3	HPRTB	147	129	0.88
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10103	105	85	0.81
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS7132	35	66	0.53
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10148	32	45	0.71
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10074	53	37	0.70
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10101	65	206	0.32
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10135	70	51	0.73
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS7423	115	103	0.90
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10146	65	78	0.83
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	DXS10079	77	38	0.49
3 kV 10 s	6.25	Evidence3	HPRTB	43	47	0.91
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS8378	257	279	0.92
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10134	263	367	0.72
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10074	174	169	0.97
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10101	184	242	0.76
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10135	217	192	0.88
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS7423	280	330	0.85
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10079	295	266	0.90
3 kV 10 s	100	Evidence4	DXS10148	182	127	0.70
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS8378	103	178	0.58
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10134	144	109	0.76
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10074	130	51	0.39
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10101	216	124	0.57
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10135	101	109	0.93

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS7423	111	78	0.70
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10079	48	65	0.74
3 kV 10 s	75	Evidence4	DXS10148	87	84	0.97
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS8378	205	117	0.57
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10134	307	126	0.41
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10074	105	41	0.39
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10101	141	132	0.94
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10135	179	130	0.73
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS7423	138	85	0.62
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10079	100	94	0.94
3 kV 10 s	50	Evidence4	DXS10148	58	99	0.59
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS8378	215	101	0.47
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10134	73	52	0.71
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10074	66	66	1.00
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10101	144	65	0.45
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10135	103	88	0.85
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS7423	80	113	0.71
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10079	45	45	1.00
3 kV 10 s	25	Evidence4	DXS10148	58	64	0.91
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS8378	393	393	1.00
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10134	62	127	0.49
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10074	53	53	1.00
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10101	90	90	1.00
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10135	58	58	1.00
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS7423	54	86	0.63
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10079	66	43	0.65
3 kV 10 s	12.5	Evidence4	DXS10148	52	52	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS8378	30	30	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS10134	126	126	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS10101	33	33	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS10135	50	50	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS7423	38	38	1.00
3 kV 10 s	6.25	Evidence4	DXS10079	49	49	1.00
3 kV 15 s	100	Evidence1	AM	2409	2381	0.99
3 kV 15 s	75	Evidence1	AM	2907	2396	0.82
3 kV 15 s	50	Evidence1	AM	3174	2092	0.66
3 kV 15 s	25	Evidence1	AM	722	831	0.87
3 kV 15 s	12.5	Evidence1	AM	359	424	0.85
3 kV 15 s	6.25	Evidence1	AM	31	56	0.55
3 kV 15 s	100	Evidence2	AM	1267	1343	0.94
3 kV 15 s	75	Evidence2	AM	1135	1029	0.91
3 kV 15 s	50	Evidence2	AM	1697	2117	0.80
3 kV 15 s	25	Evidence2	AM	787	708	0.90
3 kV 15 s	12.5	Evidence2	AM	295	226	0.77

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	6.25	Evidence2	AM	138	80	0.58
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10103	1283	1305	0.98
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS7132	870	626	0.72
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10148	202	159	0.79
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10074	494	496	1.00
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10101	246	255	0.96
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10135	354	234	0.66
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS7423	653	595	0.91
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10146	499	191	0.38
3 kV 15 s	100	Evidence3	DXS10079	328	290	0.88
3 kV 15 s	100	Evidence3	HPRTB	366	335	0.92
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10103	1360	1299	0.96
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS7132	860	1003	0.86
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10148	223	284	0.79
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10074	551	563	0.98
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10101	159	398	0.40
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10135	455	335	0.74
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS7423	750	627	0.84
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10146	472	354	0.75
3 kV 15 s	75	Evidence3	DXS10079	376	385	0.98
3 kV 15 s	75	Evidence3	HPRTB	447	426	0.95
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10103	1309	1698	0.77
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS7132	1078	864	0.80
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10148	415	342	0.82
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10074	887	629	0.71
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10101	549	493	0.90
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10135	682	530	0.78
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS7423	977	745	0.76
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10146	780	457	0.59
3 kV 15 s	50	Evidence3	DXS10079	673	533	0.79
3 kV 15 s	50	Evidence3	HPRTB	615	512	0.83
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10103	1168	1284	0.91
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS7132	1022	445	0.44
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10148	511	397	0.78
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10074	921	460	0.50
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10101	659	537	0.81
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10135	315	335	0.94
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS7423	656	869	0.75
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10146	926	468	0.51
3 kV 15 s	25	Evidence3	DXS10079	648	299	0.46
3 kV 15 s	25	Evidence3	HPRTB	736	471	0.64
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10103	1114	394	0.35
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS7132	820	472	0.58
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10148	169	211	0.80

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10074	319	499	0.64
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10101	496	505	0.98
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10135	243	307	0.79
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS7423	641	433	0.68
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10146	324	357	0.91
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	DXS10079	287	235	0.82
3 kV 15 s	12.5	Evidence3	HPRTB	215	197	0.92
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10103	162	134	0.83
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS7132	54	98	0.55
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10148	50	66	0.76
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10074	82	57	0.70
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10101	103	312	0.33
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10135	108	75	0.69
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS7423	176	160	0.91
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10146	96	119	0.81
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	DXS10079	116	60	0.52
3 kV 15 s	6.25	Evidence3	HPRTB	68	76	0.89
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS8378	391	418	0.94
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10134	387	548	0.71
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10074	262	252	0.96
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10101	278	361	0.77
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10135	321	291	0.91
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS7423	415	474	0.88
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10079	444	388	0.87
3 kV 15 s	100	Evidence4	DXS10148	270	191	0.71
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS8378	156	261	0.60
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10134	208	160	0.77
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10074	189	78	0.41
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10101	313	180	0.58
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10135	152	160	0.95
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS7423	162	113	0.70
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10079	67	95	0.71
3 kV 15 s	75	Evidence4	DXS10148	128	124	0.97
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS8378	303	173	0.57
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10134	450	185	0.41
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10074	157	65	0.41
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10101	213	195	0.92
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10135	265	192	0.72
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS7423	206	126	0.61
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10079	146	141	0.97
3 kV 15 s	50	Evidence4	DXS10148	90	146	0.62
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS8378	325	148	0.46
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10134	107	79	0.74
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10074	99	99	1.00

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10101	215	100	0.47
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10135	152	130	0.86
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS7423	121	167	0.72
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10079	62	62	1.00
3 kV 15 s	25	Evidence4	DXS10148	86	98	0.88
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS8378	585	585	1.00
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10134	95	196	0.48
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10074	79	79	1.00
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10101	137	137	1.00
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10135	81	83	0.98
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS7423	76	126	0.60
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10079	102	62	0.61
3 kV 15 s	12.5	Evidence4	DXS10148	79	42	0.53
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS8378	48	43	0.90
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS10134	187	187	1.00
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS10101	47	47	1.00
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS10135	71	34	0.48
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS7423	61	40	0.66
3 kV 15 s	6.25	Evidence4	DXS10079	69	69	1.00
3 kV 20 s	100	Evidence1	AM	3280	3230	0.98
3 kV 20 s	75	Evidence1	AM	3787	3114	0.82
3 kV 20 s	50	Evidence1	AM	4228	2798	0.66
3 kV 20 s	25	Evidence1	AM	966	1121	0.86
3 kV 20 s	12.5	Evidence1	AM	472	552	0.86
3 kV 20 s	6.25	Evidence1	AM	42	78	0.54
3 kV 20 s	100	Evidence2	AM	1690	1795	0.94
3 kV 20 s	75	Evidence2	AM	1488	1353	0.91
3 kV 20 s	50	Evidence2	AM	2318	2853	0.81
3 kV 20 s	25	Evidence2	AM	1038	935	0.90
3 kV 20 s	12.5	Evidence2	AM	386	304	0.79
3 kV 20 s	6.25	Evidence2	AM	185	107	0.58
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10103	1670	1684	0.99
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS7132	1116	801	0.72
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10148	256	203	0.79
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10074	639	633	0.99
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10101	314	323	0.97
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10135	449	297	0.66
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS7423	828	759	0.92
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10146	634	243	0.38
3 kV 20 s	100	Evidence3	DXS10079	409	365	0.89
3 kV 20 s	100	Evidence3	HPRTB	471	432	0.92
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10103	1803	1719	0.95
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS7132	1114	1304	0.85
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10148	291	372	0.78

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10074	726	731	0.99
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10101	519	426	0.82
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10135	582	428	0.74
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS7423	966	823	0.85
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10146	608	460	0.76
3 kV 20 s	75	Evidence3	DXS10079	478	494	0.97
3 kV 20 s	75	Evidence3	HPRTB	584	557	0.95
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10103	1704	2202	0.77
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS7132	1379	1113	0.81
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10148	533	432	0.81
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10074	1152	817	0.71
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10101	700	631	0.90
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10135	862	664	0.77
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS7423	1250	945	0.76
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10146	1003	579	0.58
3 kV 20 s	50	Evidence3	DXS10079	863	669	0.78
3 kV 20 s	50	Evidence3	HPRTB	796	663	0.83
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10103	1595	1718	0.93
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS7132	1371	586	0.43
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10148	674	521	0.77
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10074	1230	606	0.49
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10101	877	713	0.81
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10135	410	439	0.93
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS7423	863	1154	0.75
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10146	1237	621	0.50
3 kV 20 s	25	Evidence3	DXS10079	849	397	0.47
3 kV 20 s	25	Evidence3	HPRTB	984	628	0.64
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10103	1465	522	0.36
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS7132	1083	618	0.57
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10148	220	274	0.80
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10074	415	664	0.63
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10101	646	657	0.98
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10135	318	397	0.80
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS7423	845	557	0.66
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10146	427	470	0.91
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	DXS10079	369	301	0.82
3 kV 20 s	12.5	Evidence3	HPRTB	278	260	0.94
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10103	215	176	0.82
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS7132	73	132	0.55
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10148	62	87	0.71
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10074	105	75	0.71
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10101	137	414	0.33
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10135	138	97	0.70
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS7423	233	213	0.91

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10146	129	155	0.83
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	DXS10079	151	84	0.56
3 kV 20 s	6.25	Evidence3	HPRTB	90	95	0.95
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS8378	509	547	0.93
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10134	499	702	0.71
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10074	348	335	0.96
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10101	359	466	0.77
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10135	413	370	0.90
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS7423	534	617	0.87
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10079	562	495	0.88
3 kV 20 s	100	Evidence4	DXS10148	357	247	0.69
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS8378	205	341	0.60
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10134	274	204	0.74
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10074	252	102	0.40
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10101	414	238	0.57
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10135	199	200	1.00
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS7423	214	153	0.71
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10079	84	117	0.72
3 kV 20 s	75	Evidence4	DXS10148	167	162	0.97
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS8378	400	228	0.57
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10134	585	240	0.41
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10074	43	209	0.21
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10101	274	254	0.93
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10135	342	246	0.72
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS7423	265	159	0.60
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10079	189	38	0.20
3 kV 20 s	50	Evidence4	DXS10148	117	193	0.61
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS8378	420	194	0.46
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10134	139	103	0.74
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10074	129	32	0.25
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10101	278	132	0.47
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10135	198	169	0.85
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS7423	155	214	0.72
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10079	83	83	1.00
3 kV 20 s	25	Evidence4	DXS10148	114	124	0.92
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS8378	752	752	1.00
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10134	121	245	0.49
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10074	100	100	1.00
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10101	170	170	1.00
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10135	107	110	0.97
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS7423	107	163	0.66
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10079	123	81	0.66
3 kV 20 s	12.5	Evidence4	DXS10148	98	51	0.52
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS8378	62	56	0.90

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS10134	241	241	1.00
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS10101	59	59	1.00
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS10135	91	45	0.49
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS7423	76	58	0.76
3 kV 20 s	6.25	Evidence4	DXS10079	87	87	1.00
3 kV 10 s	100	Hueso1	AM	1924	2315	0.83
3 kV 10 s	75	Hueso1	AM	1019	1246	0.82
3 kV 10 s	50	Hueso1	AM	472	753	0.63
3 kV 10 s	25	Hueso1	AM	340	455	0.75
3 kV 10 s	12.5	Hueso1	AM	291	382	0.76
3 kV 10 s	6.25	Hueso1	AM	122	234	0.52
3 kV 10 s	100	Hueso2	AM	1517	2325	0.65
3 kV 10 s	75	Hueso2	AM	748	950	0.79
3 kV 10 s	50	Hueso2	AM	1129	1099	0.97
3 kV 10 s	25	Hueso2	AM	329	433	0.76
3 kV 10 s	12.5	Hueso2	AM	488	857	0.57
3 kV 10 s	6.25	Hueso2	AM	134	258	0.52
3 kV 10 s	100	Hueso3	AM	2347	3001	0.78
3 kV 10 s	75	Hueso3	AM	1430	1584	0.90
3 kV 10 s	50	Hueso3	AM	480	550	0.87
3 kV 10 s	25	Hueso3	AM	281	355	0.79
3 kV 10 s	12.5	Hueso3	AM	200	135	0.68
3 kV 10 s	6.25	Hueso3	AM	135	305	0.44
3 kV 15 s	100	Hueso1	AM	3428	4035	0.85
3 kV 15 s	75	Hueso1	AM	1651	2006	0.82
3 kV 15 s	50	Hueso1	AM	766	1213	0.63
3 kV 15 s	25	Hueso1	AM	468	632	0.74
3 kV 15 s	12.5	Hueso1	AM	412	543	0.76
3 kV 15 s	6.25	Hueso1	AM	179	346	0.52
3 kV 15 s	100	Hueso2	AM	2133	3202	0.67
3 kV 15 s	75	Hueso2	AM	1068	1352	0.79
3 kV 15 s	50	Hueso2	AM	1702	1652	0.97
3 kV 15 s	25	Hueso2	AM	655	862	0.76
3 kV 15 s	12.5	Hueso2	AM	617	1078	0.57
3 kV 15 s	6.25	Hueso2	AM	196	385	0.51
3 kV 15 s	100	Hueso3	AM	3573	4507	0.79
3 kV 15 s	75	Hueso3	AM	2083	2288	0.91
3 kV 15 s	50	Hueso3	AM	354	407	0.87
3 kV 15 s	25	Hueso3	AM	430	538	0.80
3 kV 15 s	12.5	Hueso3	AM	232	156	0.67
3 kV 15 s	6.25	Hueso3	AM	193	429	0.45
3 kV 20 s	100	Hueso1	AM	4448	5248	0.85
3 kV 20 s	75	Hueso1	AM	2148	2647	0.81

Condiciones de inyección	Dilución	Muestra	Marcador	Lower Peak	Higher Peak	PHR
3 kV 20 s	50	Hueso1	AM	858	1363	0.63
3 kV 20 s	25	Hueso1	AM	703	953	0.74
3 kV 20 s	12.5	Hueso1	AM	562	733	0.77
3 kV 20 s	6.25	Hueso1	AM	240	460	0.52
3 kV 20 s	100	Hueso2	AM	2808	4165	0.67
3 kV 20 s	75	Hueso2	AM	1393	1761	0.79
3 kV 20 s	50	Hueso2	AM	2236	2162	0.97
3 kV 20 s	25	Hueso2	AM	873	1163	0.75
3 kV 20 s	12.5	Hueso2	AM	911	1612	0.57
3 kV 20 s	6.25	Hueso2	AM	254	491	0.52
3 kV 20 s	100	Hueso3	AM	4764	6011	0.79
3 kV 20 s	75	Hueso3	AM	2638	2876	0.92
3 kV 20 s	50	Hueso3	AM	884	1012	0.87
3 kV 20 s	25	Hueso3	AM	573	706	0.81
3 kV 20 s	12.5	Hueso3	AM	370	250	0.68
3 kV 20 s	6.25	Hueso3	AM	263	588	0.45