



**PROVINCIA DE BUENOS AIRES**  
**PODER JUDICIAL**

Laboratorio de Análisis Comparativo de ADN  
Dirección General de Asesorías Periciales  
41 y 119- 1900 La Plata

USO OFICIAL – JURISDICCIÓN ADMINISTRACIÓN DE JUSTICIA

**Suprema Corte de Justicia**  
**Provincia de Buenos Aires**

**Dirección General de Asesorías Periciales**  
**Laboratorio de Análisis Comparativo de ADN**

## 1. OBJETIVOS

Atender los requerimientos de análisis de ADN humano por vía judicial, de todos los Departamentos de la Provincia de Buenos Aires con enfoque a:

- Identificar el/los individuo/s generador/es de un rastro biológico
- Agrupar las causas de delitos contra la integridad sexual con autor ignorado sobre la base de los perfiles genéticos obtenidos a partir de los rastros
- Identificar restos cadavéricos por cotejo con familiares directos
- Determinar la pertenencia a un grupo familiar (Filiación)
- Actualizar la metodología para el logro de los objetivos con máxima eficiencia
- Incorporar nuevas tecnologías para lograr los objetivos con máxima eficiencia
- Mantener en nivel de calidad con ajuste a las normas ISO 17025 (en etapa de implementación).

## 2. ORGANIZACIÓN DEL SERVICIO

El servicio cuenta con cuatro áreas de trabajo:

- Administración:
- Filiación
- Rastros biológicos
- Perfiles genéticos

## 3. RECURSOS HUMANOS

### **Jefe de Servicio:**

María Mercedes Lojo

Título : Dra en Ciencias Bioquímicas

Función: Organización, supervisión y coordinación general- Validación y valoración de la efectividad de las técnicas empleadas.

### **Peritos**

#### Área Filiación

María Atilia Gomez

Título: Dra en Ciencias Naturales- Especialista en Genética Forense (SAGF)

Función: Producción de pericias- Control de calidad

María Amelia Pena

Título: Lic. En Biología- Especialista en Genética Forense (SAGF)

Función: Producción de Pericias- Control de calidad



Área Rastros Biológicos

Andrea Colussi

Título: Lic. En Biología- Especialista en Genética Forense (SAGF)

Función: Producción de pericias- Agrupación de perfiles de autor ignorado- Validación de Protocolos

María Isabel Ortiz

Título: Lic. en Biología

Función: Producción de pericias- Control de seguridad e higiene en el Laboratorio

Walter Rubén Bozzo

Título: Bioquímico- Especialista en Genética Forense (SAGF)

Función: Producción de pericias- Coordinación del plan de capacitación

Lisandro Laborde

Título: Bioquímico

Función: Coordinación del Laboratorio y Procesamiento de las muestras- Control de calidad- Validación de protocolos

**Personal Técnico**

Área Obtención de ADN

Julieta Beltramo

Lic. en Biología- Especialista en Genética Forense (SAGF)

Función: Coordinación Area Filiación- Interpretación de perfiles-

Greta Carini

Lic. En Biología

Función: Coordinación general Cuerpo técnico-Procesamiento de restos cadavéricos y de rastros biológicos de bajo contenido de ADN

Lucrecia Canutti

Técnica de Laboratorio

Función: Procesamiento de restos cadavéricos y de rastros biológicos de bajo contenido de ADN- Rastros biológicos en general- Preparación de soluciones y reactivos

Juan Manuel Sanchez

Técnico de Laboratorio

Función: Apoyo técnico Area Filiación- Obtención ADN rastros.

Virginia Perez Balbi

Técnica

Función: Archivo desarchivo de efectos- Entrega de Efectos- Notificaciones

#### Área Obtención de Perfiles Genéticos

Juan Pablo Pilili

Título: Dr. En Ciencias Naturales

Función: Manejo del secuenciador – Obtención y control de perfiles

Elisa Pozzi

Título: Médico veterinario y Bacteriologa Clínica e Industrial

Función: Manejo del secuenciador- Control de stock – Control de calibración y de mantenimiento de equipos

#### Área Administrativa

Adriana Cauterou

Función: Manejo de Mesa de Entradas y Archivo de papeles

Diego Perez

Función: Confección de pericias- Estadísticas- Supervisión y control de mantenimiento general- Baja y devolución de efectos- Administrador del LIMS

#### **4. INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE**

El Servicio de Análisis Comparativo de ADN cuenta con 8 Laboratorios, que definen las áreas de trabajo independientes de acuerdo a las normas de procedimiento para las metodologías empleadas:

- Laboratorio de toma de muestras
- Laboratorio de extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas en tarjeta FTA.
- Laboratorio de apertura de efectos
- Laboratorio de procesamiento de restos cadavéricos, equipada con campana para riesgo biológico.
- Laboratorio de extracción de ADN a partir de rastros biológicos equipada con cámara de Flujo Laminar y equipo automatizado para la extracción de ADN (Automate, Biosystems, fig. 1)



Fig. 1 Equipo de extracción automatizada "Automate Express" (Applied Biosystem).

- Laboratorio de preparación de reacciones para la amplificación por PCR (Pre-PCR), equipado con cámara con flujo laminar y luz UV (fig. 2)



Fig. 2. Cámara de flujo laminar con lámpara UV (ESCO).

- Laboratorio de amplificación, equipado con 2 termocicladores GeneAmp PCR 9700- Applied Biosystems), 3 termocicladores Applied Biosystems Verity (fig. 3) y un termociclador para PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (fig. 4).



Fig. 3. Termociclador “Veriti” (Applied Biosystem).



Fig. 4. Termociclador en tiempo real “7500” (Applied Biosystem).

- Laboratorio de obtención de perfiles genéticos, equipado con un secuenciador automático ABI3130 de 4 capilares (Applied Biosystems) y un secuenciador automático **ABI3500** de 8 capilares (Applied Biosystem) (fig. 5) y una centrífuga Eppendorf con accesorio para placas.



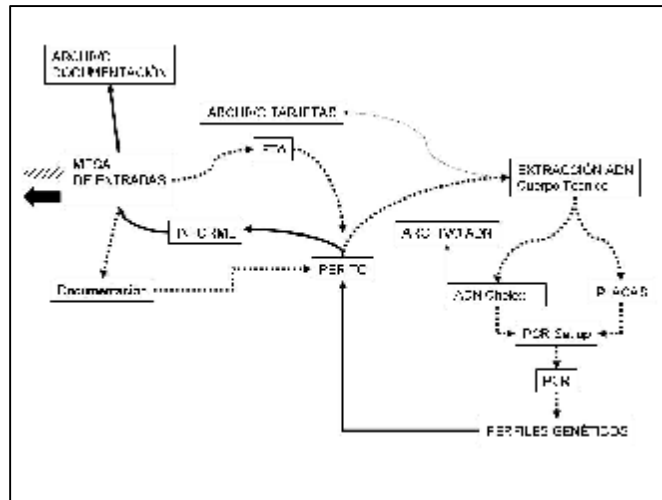
Fig. 5. Secuenciador genético “ABI3500” (Applied Biosystem,).

## 5. FLUJO DE TRABAJO

### Área Filiación

Las pericias de filiación se realizan con muestras de sangre o saliva en tarjetas FTA. En este caso, por estar optimizados los protocolos, las muestras no se cuantifican, salvo los casos excepcionales en los que se requiere la purificación de las muestras o en los casos de restos cadavéricos.





#### Extracción de Muestras de sangre o saliva:

El Perito a Cargo organiza las muestras que se van a correr en cada placa de amplificación, registrando electrónicamente en el formulario de placas (base de datos de Access actualmente en uso), para la planilla de trabajo de los técnicos.

El técnico a cargo pica las tarjetas correspondientes a la placa (consignados en la planilla de trabajo electrónica), de acuerdo al orden (por ahora el proceso es manual ya que todavía no se implementó el sistema de código de barras). Se lavan las muestras y se amplifica la placa.

Para el caso que se requieran re-extracciones o amplificaciones de las muestras por otros sistemas, el perito ingresa la solicitud en el formulario de la BD (Access).

Mediante una consulta, el técnico recibe la orden de re-extracción y de re-amplificación

Las tarjetas se archivan en el archivo FTA y la documentación vuelve al perito.

#### Extracción de Restos Cadavéricos

El perito ingresa los datos de las muestras (descripción, Fotos etc.).

Solicita la extracción al cuerpo técnico mediante la planilla de trabajo.

El técnico completa la planilla de acuerdo al los procedimientos realizados (se contempla la posibilidad de que en el proceso intervengan 2 operadores)

Una vez extraído el ADN, la muestra pasa a la lista de **cuantificación** (ver Cuantificación en rastros biológicos).

De acuerdo a los resultados de la cuantificación, se normalizan las concentraciones y la muestra pasa a la planilla de amplificación

#### Obtención de perfiles y análisis

Se amplifican las muestras de acuerdo a la planilla de trabajo, confeccionada de acuerdo a los datos ingresados por el perito

Se corren las muestras en el secuenciador respetando los cronogramas establecidos en los registros electrónicos. La identificación electrónica de la placa es por fecha de corrida (no se cuenta por el momento con el sistema de código de barras)

El profesional encargado de los perfiles genéticos analiza los mismos de acuerdo a las condiciones establecidas en el Manual de Laboratorio. Cuando el caso así lo requiere se realizan nuevos análisis, para ampliar la información, mediante los reactivos YFiler<sup>20</sup>, PowerPlex 21<sup>24</sup>, NGM<sup>25</sup>, o X- Argus<sup>26</sup>.

Las tablas con los perfiles genéticos se exportan a una base de datos de access (la que usamos por el momento) que vincula las muestras analizadas con los perfiles aprobados (Por el analista y por el perito). Mediante una consulta se exportan los datos a las planillas de análisis de Excell y se confecciona automáticamente la tabla de resultados, mediante un sistema electrónico diseñado por la Dra. Mercedes Lojo

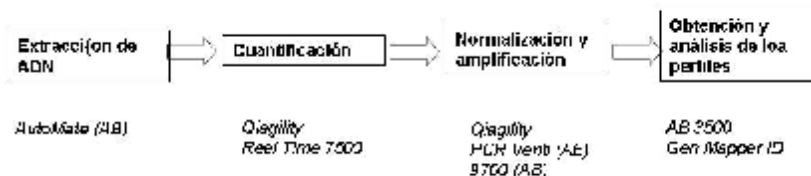
El perito confecciona el informe. PARA AQUELLOS CASOS EN LOS QUE EL ANÁLISIS EXCLUYE EL VÍNCULO, SE REPITE EL ANÁLISIS. EL SUPERVISOR CONTROLA LA PERICIA Y FIRMA CON EL PERITO.

### Área de Rastros Biológicos

El flujo de trabajo es similar al de filiación, pero en este caso se incorpora la cuantificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los rastros. Se generan 3 Códigos únicos en el proceso. La CUIE (Clave única de identificación de efecto) se asigna en Mesa de Entrada. La relación de la CUIE con CUIM (Identificación de muestra) puede ser uno a varios (se pueden tomar distintas muestras del mismo efecto- por ejemplo recortes de manchas de la misma prenda). A la parte de la muestra que se procesa se le asigna otro código único, que identifica a la muestra de ADN que se obtiene y al perfil resultante del proceso.



El flujo de trabajo en el proceso experimental se reproduce en el gráfico siguiente:



El perito recibe el perfil aprobado por el experto encargado del área de producción de perfiles, lo aprueba y produce el informe, que se discute con el equipo de trabajo, en caso de que así se requiera.

## 6. METODOLOGÍA CIENTIFICA

### Obtención de ADN

Los métodos aplicados y los reactivos empleados se encuentran validados por Organismos Internacionales para su uso en Ciencia Forense. Los procedimientos se realizan de acuerdo al Manual de Laboratorio vigente.

Según la cantidad de material presente en la muestra, se usan dos protocolos alternativos:

DNA IQ System (Promega): Cuando el tamaño de la mancha es limitado, se procesa la misma con el método de extracción de resinas magnéticas 7.

Filamentos pilosos:

El bulbo se procesa por purificación en columnas QuiAmp DNA Minikit 8, Si la muestra es escasa se emplean como alternativa las columnas QuiAmp DNA Microkit9 ó Machery Nagel XS10(Protocolos en etapa de validación interna)

Muestras de semen:

Se procesan según el protocolo de lisis diferencial 11. La fracción femenina se extrae con Chelex12 y la fracción espermática se extrae con reactivo DNA IQ System (Promega), según protocolo modificado y validado en estos Laboratorios13, 14, 15.

Restos cadavéricos:

Las muestras correspondientes a restos cadavéricos se procesan siguiendo el protocolo validado en estos Laboratorios12, usando para la extracción/ purificación del ADN las columnas QuiAmp DNA Minikit (QiaGen)16.

Otro tipo de soportes:

Dependiendo de la cantidad de muestra disponible se emplean alternativamente las extracciones con QuiAmp DNA Minikit 8, QuiAmp DNA Microkit9 ó Machery Nagel XS10 (Protocolos en etapa de validación interna)

### Cuantificación

Se emplea el método PCR en tiempo real con sondas fluorescentes de acuerdo al protocolo publicado por y colaboradores 17, usando el equipo de PCR en tiempo real Biosystems 7500

Las muestras para amplificación se preparan en la cámara de PCR, que cuenta con flujo laminar y luz UV.

De acuerdo a los resultados de la cuantificación se ajusta la concentración de las muestras por dilución de las mismas, operación que se realiza en el Laboratorio de rastros biológicos.

### Amplificación

Dada la mayor sensibilidad para la detección de perfiles, validada en estos Laboratorios se usa el reactivo IdentiFilerPlus (Applied Biosystems)<sup>19</sup>. Si el caso así lo requiere, se completa la información con los reactivos MiniFiler (Biosystems)<sup>20</sup> y/o YFiler<sup>21</sup>(Biosystems) y/o NGM<sup>24</sup> (Biosystems).

### Obtención de perfiles genéticos

El procesamiento de las muestras se realiza en el laboratorio localizado en la zona Post-PCR. Las muestras se procesan por personal entrenado especialmente para este fin y se analizan en el Secuenciador ABI3130 de 4 capilares (Applied Biosystems) ó en el secuenciador automático AB 3500 (8 capilares)(Applied Biosystem).

Los perfiles se analizan mediante el Software GenMapper IDX<sup>27</sup>, siguiendo pautas preestablecidas para la interpretación de los mismos.

Los perfiles aprobados pasan al perito para su análisis.

Los perfiles no aprobados se notifican al perito para que tome la decisión a seguir, de acuerdo a las pautas establecidas en el manual de laboratorio.

### Validación de protocolos y control de eficiencia.

La validación de protocolos se realiza con el objetivo de determinar la eficiencia para la recuperación de perfiles a partir de distintos tipos de muestra, con diferentes métodos de extracción, trabajando con muestras simuladas. Se seleccionan de esta forma los métodos más sensibles, y se prueban los ensayos que involucran nuevas metodologías. Esta actividad se encuentra supervisada por la Jefatura.

A través de las estadísticas mensuales se evalúa la eficiencia de la metodología para la recuperación de perfiles genéticos en los casos reales, discriminados por tipo de muestra procesada. Asimismo, a través de las estadísticas se controla la eficiencia alcanzada por cada perito en la resolución de los casos.



## 7. CONTROL DE CALIDAD

El Servicio realiza dos ejercicios de control de calidad anuales organizados respectivamente por el Grupo Español Portugués de Genética Forense y por la Sociedad Argentina de Genética Forense.

## 8. ACTUALIZACIÓN Y CAPACITACIÓN

Con la coordinación del Dr. Walter Bozzo, se está llevando adelante la realización de seminarios de actualización y cursos de perfeccionamiento en Genética Forense, con seminarios y curso de asistencia obligatoria para profesionales y técnicos del servicio, de acuerdo al plan de capacitación aprobado por la Dirección General.

## 9. Bibliografía

1. DNA Advisory Board, 2009, Quality assurance standards for DNA databasing laboratories. <http://www.cstl/nist.gov/div831/strbase/index.htm>
2. DNA Advisory Board, 2009, Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories.
3. <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/index.htm>
4. ENFSI DNA Working Group. 2013. DNA-Database management review and recommendations. <http://www.enfsi.eu>
5. National Research Council. 1996. The evaluation of forensic DNA evidence. National Academy Press, Washington D.C.
6. Watman FTA Protocol 307. [www.whatman.com/UserFiles](http://www.whatman.com/UserFiles)
7. Budowle B.; Smith J.; Moretti T. Y Di Zinno J. 2000. Extraction of DNA. En DNA typing protocols: Molecular Biology and forensic analysis. Bioforensic Science Series. Eaton Publishing.
8. DNA IQ™ System- Small Sample Casework Protocol. [Hptt/ www. Promega. com](http://www.Promega.com)
9. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA blood Minikit handbook. 2008. QIAGEN
10. QIAamp® DNA Micro handbook. 2008. QIAGEN
11. Genomic DNA from tissue. 2007- User manual Nucleospin® Tissue XS- Macherey- Nagel
12. Gill P., Jeffreys A.J., and Werret D.J. 1985. Forensic applications of DNA fingerprintings. Nature. 318: 557-579
13. Lazzarino F., Colussi, Lojo M.M. Efficiency of DNA IQ system in recovering semen DNA from cotton swabs. 2006. Forensic Science Communications. (Disponible on lines)
14. Bozzo W, 2009. DNA recovery from different type of evidences in 300 cases of sexual assault. Forensic Science International: Genetics Supplements Series.

15. Colussi A., Viegas M. y Lojo M.M. 2009. Efficiency of DNA IQ System in recovering semen DNA from cotton swabs. en Forensic Science International: Genetics Supplements Series.
16. Colussi A., Beltramo J., Viegas M. y Lojo M.M. 2009. Assessment of the effectiveness of human remains DNA typing: Analysis of 134 cases. Forensic Science International: Genetics Supplements Series.
17. Jerilyn A. Walkera, Dale J. Hedgesa, Benjamin P. Perodeaua, Kate E. Landrya, Nadica Stoilovaa, Meredith E. Labordeaa, Jaiprakash Shewaleb, Sudhir K. Sinhab,Mark A. Batzera, 2005.
18. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification. Analytical Biochemistry 337 :89–97
19. PowerPlex 16 System. Instructions for use of products DC6530. <http://promega.com>
20. AmpFISTR Identifiler. PCR Amplification kit. User´Manual.2012
21. AmpFISTR Miniifiler. PCR Amplification kit. User´Manual. 2012
22. AmpFISTR Yfiler. PCR Amplification kit. User´Manual. 2012
23. PowerPlex 21System. Instructions for use of products DC6530. <http://promega.com>
24. AmpFISTR NGM. PCR Amplification kit. User´Manual. 2012
25. Investigator X- Argus 12 Handbook- Qiagen- 2010
26. GenMapper ID-X Software- Users Guide- Applied Biosystems