Laboratorio de Investigación Forense
Ministerio Público Fiscal

Procurador General
Dr. Jorge Luis Miquelarena

Procurador General Adjunto
Dr. Emilio Porras Hernández

Coordinadora Jurídica
Dra. Viviana Adriana Fernández

Representante Técnico
María Verónica Herrero Ducloux
Médica Anatomopatóloga

Profesionales
Gabinete Anatomopatología

Trinidad Sotero Ojeda Insaurralde
Médico Anatomopatólogo

María Verónica Herrero Ducloux
Médica Anatomopatóloga

Jacobo Mathías
Técnico Histopatológico y Eviscerador

Gabinete Toxicología
Adriana Ángela Pérez
Doctora en Bioquímica

Gabinete Genética
Noelia Andrea Massari
Doctora en Bioquímica

MINISTERIO PUBLICO FISCAL
PROVINCIA DEL CHUBUT

REGLAMENTO GENERAL DEL LABORATORIO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN FORENSE – MINISTERIO PÚBLICO FISCAL

OBJETIVO: articular la actividad del Laboratorio de Investigación Forense con operadores judiciales, cuerpo Médico Forense y policía criminalística.-

I. Normas Generales

Artículo 1. FUNCIONES. Los profesionales del Laboratorio Regional de Investigación Forense cumplen las siguientes funciones:

- Realizar las pericias sobre cualquier tipo de muestras, biológicas y no biológicas, relacionadas con un hecho delictivo.
- Confeccionar los informes de la especialidad.
- Asesorar en áreas de su competencia cuando sus conocimientos científicos resulten necesarios para conformar una decisión del órgano requirente.
- Asegurar las muestras y material pericial recibidos para la práctica científica.
- Capacitar a los operadores del sistema judicial
- Investigar técnicas y procedimientos aplicables para la resolución de casos forenses

Artículo 2. OBJETIVIDAD, LEGALIDAD Y VERDAD MATERIAL. En su condición de funcionarios públicos, los integrantes del Laboratorio Regional de Investigación Forense, deberán guardar estricto apego a los criterios de objetividad y legalidad. Sus actividades de investigación estarán siempre basadas en las reglas del arte y orientadas al descubrimiento y esclarecimiento de la verdad.

Artículo 3. CARÁCTER RESERVADO DE LOS ESTUDIOS. Toda documentación, estudios e informes conservados en el Laboratorio tienen carácter reservado (art. 257 Código Procesal Penal).
Con excepción de los peritos de parte designados y/o auxiliares técnicos, la extracción de copias y consultas de documentación, estudios e informes, sólo será posible mediando autorización escrita del Fiscal del caso, donde conste la identificación de la persona autorizada.

Artículo 4. INFORMES PREEXISTENTES Los profesionales del Laboratorio podrán utilizar para la elaboración del dictamen técnico estudios previos o cualquier otra información o documentación a la que accedan, pero en ningún caso constituirán su fundamento científico único o determinante.

II. Procedimiento

Artículo 5. SOLICITUD DE INTERVENCION. Los profesionales del Laboratorio darán cumplimiento a las solicitudes del Cuerpo Médico Forense y de Fiscales Generales, Funcionarios del Ministerio Público Fiscal o Jueces, de la provincia o de otras jurisdicciones.-
Los requerimientos se canalizarán por conducto del Coordinador Jurídico quien, en su carácter de unidad ejecutora, administrará las prácticas o actuará como unidad requirente respecto a las pericias que se soliciten a los Laboratorios de la Red.-

Artículo 6. ARANCELES. Las prácticas llevan el arancel que corresponde a la especialidad. Las sumas ingresaran a una cuenta especial del Ministerio Público Fiscal y serán destinadas al mantenimiento y funcionamiento del Laboratorio Regional.

Artículo 7. TOMA, CONSERVACIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS. La remisión de muestras para la realización de prácticas científicas en el ámbito del

Laboratorio debe realizarse con la respectiva cadena de custodia para preservar la autenticidad de los mismos (art. 267 CPP), y conforme a metodología de recolección, conservación y envío establecido por el Laboratorio Regional de Investigación Forense -Anexo I, II, III y VIII que forman parte del presente.-

Artículo 8. INGRESO DE LA PRÁCTICA. Recepcionada la/s muestra/s se verificará la documentación respaldatoria y el estado general del envío, se asentará su ingreso en el Sistema Informático de Registro de Ingresos y asignara número de protocolo.

Artículo 9. FIJACION DE FECHA DE INICIO Y CONTROL DE PARTES. El profesional competente fijará fecha y hora de inicio del estudio teniendo en cuenta el asiento del órgano requirente ,respetando un orden de prelación en el que se ponderará la fecha de solicitud como así también la complejidad y urgencia de la labor requerida.
La fecha y hora de inicio del estudio se comunicará al Fiscal del caso o Juez requirente a efectos de su notificación a las partes.-
Cuando el estudio al que deben someterse la/s muestra/s macroscópicas pueda agotarlas, impidiendo otro ulterior, el profesional a cargo de la práctica comunicará tal circunstancia al Fiscal o Juez para que adopte los recaudos en materia de control de parte.-

Artículo 10. INTERVENCION DE PERITOS DE PARTES. Serán admitidos peritos de partes (art. 198 CPPCh) y auxiliares técnicos (art.125 CPPCh), cuando su designación conste en las actuaciones remitidas al laboratorio.
Los peritos deberán tener título habilitante en la materia relativa al punto sobre el que dictaminarán (art. 196 Código Procesal Penal).
Los peritos podrán dictaminar por separado cuando exista diversidad de opiniones entre ellos (art 201 del Código Procesal Penal).
La incomparecencia de peritos de parte o auxiliares técnicos no suspenderá la práctica científica lo que se hará constar en el informe final.

Artículo 11.- INICIO DE PERICIA Y EVALUACIÓN FORMAL. El profesional responsable de la práctica científica procederá a la apertura de la muestra que podrá ser ACEPTADA, ACEPTADA CON RESERVA o RECHAZADA, de conformidad con las pautas fijadas para la toma, conservación y envío de las muestras.- (Anexo IV Circuito para recepción de muestras).
Las muestras rechazadas serán devueltas con las observaciones constatadas.-

Artículo 12. PERICIA. Aceptada o Aceptada con reservas las muestras biológicas o no biológicas se dará comienzo a la práctica científica de conformidad con las pautas establecidas en los manuales de procedimiento técnico (Anexo V, VI y VII).

Artículo 13. INFORMES. El informe deberá contener:

A. Datos generales:
    1. Lugar y fecha de realización del informe
    2. Identificación completa del Laboratorio: nombre, organismo del que depende, domicilio
    3. Identificación única del informe: número de protocolo o código
    4. Entidad solicitante
    5. Número y carátula del caso y/o investigación penal en la que se enmarca la pericia realizada
    6. Objetivo del análisis o puntos de pericia solicitados.
    7. Fecha y hora de inicio de la pericia.

B. Muestras analizadas. Se realizará una descripción detallada del material pericial. Podrá ser acompañado de documentación fotográfica.
C. Metodología de análisis.
D. Resultados y conclusiones. Las inferencias del análisis de los resultados deberán expresarse en forma clara, sencilla y sin ambigüedades, a fin de que el informe pericial sea correctamente interpretado.
    Las conclusiones pueden ser complementarias de otros estudios o definitivas.

E. Comentarios. Se deberá indicar si existe o no muestra disponible para futuros análisis. Sugerir la realización de otros estudios en aquellos casos que se considere necesario. Podrá incluir otra información, comentario o sugerencia pertinente.
F. Bibliografía
G. Firma y sello aclaratorio del profesional interviniente. Deberá constar en todas las hojas y al final del informe.-

El informe será entregado dentro de un plazo mínimo de 8 días y 20 días de máximo a partir del inicio del estudio.-

Artículo 14. Concluido el estudio de las muestras aceptadas o aceptadas con reserva y producido el informe, el material pericial se devolverá al Cuerpo Médico Forense y/o Oficina de Secuestros con la debida cadena de custodia (Acordada 4016/12bis), quedando en resguardo del Laboratorio los tacos, vidrios y copias de los informes.

Artículo 15. TIEMPO DE CONSERVACION. DESTRUCCIÓN Los tacos y vidrios se conservarán por el término de DIEZ años y su resguardo será debidamente individualizado. En el caso del vidrio deberá estar grabado de forma físico indeleble mediante lápiz diamante, y el taco de parafina deberá estar adherido en su base a un molde de inclusión de plástico numerado con lápiz de grafito.-
Vencido el plazo de conservación dichos elementos serán destruidos conforme se detalla: a) los tacos se desparafinan con estufa de secado y posteriormente la muestra biológica se incinera como residuo patológico, la parafina como residuo tóxico y la canastilla que contenía el taco se reutiliza; b) el vidrio junto con la muestra se destruyen como elementos punzo cortantes.

Artículo 16. DISPOSICIONES COMPLEMENTARIAS. Se aplicaran en lo pertinente y en cuanto fuera compatible con la actividad las normas de la Ley XV nro. 9 y Ley V nro. 94.-

ANEXO I

TOMA Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS PATOLOGICAS

Preservación de las muestras biológicas conforme estándar de calidad fijado por el Gabinete de Patología Forense del Laboratorio Regional de Investigación Forense:

- Preparación de la muestra macroscópica obtenida de autopsias: incluir en formol al 10% en un recipiente lo suficientemente amplio para su correcta fijación. Se sugiere un volumen de formol dos tercios superior al de la pieza.
- La muestra debe estar correctamente rotulada con lápiz de grafito negro y datos para su individualización, acompañado de la respectiva cadena de custodia y documentación respaldatoria.
- Se rechazará toda muestra que no tenga, al menos, número de caso y carátula e identificación de la muestra;
- Se sugiere la remisión de las muestras dentro de las 48hs. de realizada la autopsia. De no ser posible, debe procurarse realizar el cambio completo de formol al 10% cada 48hs., con un mínimo de tres cambios para piezas a almacenar durante un largo tiempo.

RECOMENDACIONES

- En caso de mala praxis, muerte de niños y lactantes y otros que se consideren necesarios v.g. reautopsias, exhumaciones, etc., se sugiere el envío del bloque de órganos completo.
- En caso de autopsias parciales, las muestras enviadas deben ser representativas de cada órgano, recomendándose un pool mínimo de vísceras (pool básico) compuesto por:

-Cerebro completo

-Corazón completo

-Riñón completo

-Pulmón un lóbulo completo

-Segmento hepático

-Segmento de páncreas

- En caso de lesión por arma blanca o por arma de fuego se recomienda que la muestra incluya la totalidad de la misma incluyendo buen margen de área sana tanto en superficie como en profundidad
- En caso de lesiones por electricidad muestrear piel o zona sospechosa de la entrada de electricidad, y si presentaran lesión tomar tejido subcutáneo, músculo o huesos. Enviar además pool básico de vísceras.
- En caso de muerte asociada a quemaduras (Fuego, carbonización, ácidos o álcalis) muestrear vísceras del aparato respiratorio (laringe, tráquea), sistema digestivo alto y enviar junto con el pool básico de vísceras.
- En caso de intoxicaciones muestrear mucosa digestiva alta desde boca hasta estómago y adjuntar al pool básico de vísceras.
- En caso de muerte por ahorcamiento o estrangulación remitir la piel donde quedó la impresión del surco.

-Planos musculares superficiales y profundos supra e infrahioideos y prevertebrales

-Faringe

-Laringe y hueso hioides

-Paquete vasculo nervioso latero cervical: carótidas, yugulares y neumogástrico

- En casos de muerte en asociación con embarazo remitir junto con el pool básico de vísceras pieza de histerectomía completa: útero más anexo (ovarios y trompas, parametrios uterinos), placenta completa y sus anexos (cordón umbilical y membranas).

ANEXO II

TOMA Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS TOXICOLOGICAS

En las investigaciones de muerte, el tipo y la cantidad de fluido biológico a remitir dependerán de la droga o tóxico químico a investigar.

MUESTRAS	CANTIDAD	ESTUDIO	CONSERVACIÓN
Sangre cardíaca(*) **Con** anticoagulante	30 ml (lado derecho del corazón, vena cava inferior, etc.)	Colinesterasa Alcoholemia CO	Heladera (máximo 2 semanas)
Sangre periférica (*) **Con** anticoagulante	10 ml (vena femoral derecha o izquierda)	Colinesterasa Alcoholemia CO	Heladera (máximo 2 semanas)
Sangre periférica (*) **Sin** anticoagulante	10 ml (vena femoral derecha o izquierda)	LDH CPK Colinesterasa	Centrifugar lo antes posible y separar el suero El suero Freezer
Orina	Todo lo disponible	Drogas Alcohol	Heladera , si no se envía inmediatamente Freezer
Humor vítreo (*)	Todo lo disponible y separado de cada ojo	Drogas Alcohol	Heladera , si no se envía inmediatamente Freezer
Contenido estomacal	Todo lo disponible		Freezer
Bilis	Todo lo disponible	Opiáceos	Freezer
Cerebro	25-50 gr	Sustancias liposolubles, drogas	Freezer

Riñón, Hígado, Bazo	25-50 gr	Tóxicos en general	Freezer
Pulmón	25-50 gr	Gases	Freezer
Hisopados (nasal, vaginal, otros)	Los que se consideren convenientes		
Grasa subcutánea y/o músculo esquelético (**)	Piel y grasa adyacente. Músculo del sitio de interés	Insecticidas organoclorado	Freezer
Pelo	Mechón cortado en la base del cráneo del tamaño de un lápiz. Marcar el extremo de la raíz y punta. Envolver en papel metalizado.		

(*) **Sin Cámara de aire** se logra llenando el recipiente hasta el borde asegurando muy bien su cierre

(**) Para investigar posibles sitios de inyección, se debe remitir, además del posible lugar de inoculación, una muestra blanco de grasa y/o músculo alejada del sitio de inyección.

Cada tipo de muestra presenta sus ventajas dependiendo de la sustancia a investigar, por lo que se sugiere recolectar el mayor número de ellas y mantenerlas en resguardo hasta que se decida qué análisis se solicitará.

RECOMENDACIONES

SANGRE

Para la toma de muestra se desinfectará la piel con alcohol, ***excepto en el caso de determinación de alcoholemia*** (en este caso recurrir a solución jabonosa, agua oxigenada, iodopovidona, etc.)

Ante la sospecha de una intoxicación de origen desconocido se deberá recoger la muestra de sangre en dos tubos, uno de ellos con anticoagulante (Heparina o EDTA) y otro tubo sin anticoagulante (o con gel acelerador de coagulación). En el caso de tener que asegurar la estabilidad de la muestra, se recomienda reemplazar la heparina por **fluoruro de sodio** al 1% (como preservador antibacteriano). El volumen recomendable en cada caso será de 5ml.

Para **suero no usar anticoagulante** (determinación de colinesterasa, enzimas)

La conservación de la muestra se hará en **heladera a 4°C**. Los recipientes que se envían deben ser tubos de polipropileno o similar con cierre hermético. Es preferible utilizar material nuevo o virgen, para evitar contaminaciones (muchas veces quedan restos de medicamentos y otras sustancias que no se extraen con lavado "casero", provocando confusiones en el ulterior estudio analítico).

Cuando se envasa sangre o suero, ***no debe quedar espacio vacío en el recipiente***, es decir se debe evitar la formación de una cámara de aire, que produce pérdidas importantes no solo de etanol, sino de cualquier otro tóxico volátil. Para evitar esto, el recipiente debe ser llenado al ras, bien tapado y si es posible sellado.

En los casos de extracciones a imputados de un ilícito, se recomienda la extracción de por lo menos ***dos*** muestras sanguíneas consecutivas, **con intervalo de una hora** entre ambas extracciones para cálculos retrospectivos de alcoholemias. **Informar además hora del hecho, hora de extracción de la muestra y peso en kg del imputado.**

ORINA

Este tipo de muestra es idónea para realizar un estudio de "screening" en el caso de no conocer el origen de la intoxicación. Otra ventaja es que la concertación del analito puede ser mayor que en sangre. Además, en general, la orina está exenta de

proteínas, con lo cual se tienen menos interferencias. Es una muestra más abundante, fácil de recolectar y de conservar.

No utilizar conservante

Las muestras se remitirán inmediatamente al laboratorio, manteniendo la cadena de frío. Hasta su análisis, las muestras deberán ser mantenidas a -20°C, para evitar degradación, o a 4°C, pero por un tiempo no mayor de 24hs.

VÍSCERAS

Deben colocarse en recipientes rigurosamente limpios, sin agregado de ningún tipo de sustancia con fines de preservación u otro motivo.

Debe disponerse de un recipiente para cada órgano. Como mínimo se deben obtener muestras de los siguientes órganos: estomago y su contenido, vesícula biliar y su contenido, cerebro, pulmón, riñón e hígado. En casos particulares, a criterio del profesional interviniente, se podrán agregar muestras de otros órganos.

Los recipientes pueden ser de plástico, aunque si se dispone de frascos de vidrio color caramelo, estos serán apropiados especialmente para sustancias que se conozcan como fotosensibles. El tamaño debe estar en relación con el de la muestra, evitando en lo posible la existencia de cámaras de aire.

El cierre debe ser perfecto. Si no es posible, sellar con parafina. No deben usarse tapas de papel, algodón o cartón. Pueden utilizarse recipientes plásticos con tapas del mismo material que permitan un cierre perfecto.

La conservación de las muestras hasta su análisis será a una temperatura ideal de -20°C, a la cual la actividad enzimática en los sistemas biológicos se halla prácticamente paralizada. Estudios de degradación de analitos muestran que a esta temperatura los tejidos y humores biológicos sufren poca pérdida de los mismos por biotransformación. Se admitirá la conservación a 4°C siempre que el tiempo no supere las 24 hs. en el caso de sospecha de tóxicos volátiles solo se admitirá la conservación a -20°C. Las muestras serán embaladas en recipientes apropiados para conservar el frío, asegurando que los recipientes contenidos dentro de la caja de transporte no puedan sufrir roturas durante el traslado al laboratorio.

Es importante respetar el mantenimiento de la cadena de frío durante el traslado, manteniendo las condiciones iniciales de temperatura.

Enviar cada órgano por separado en la medida de lo posible.

NUNCA se conservan en formol muestras destinadas al análisis químico-toxicológico.

HUMOR VÍTREO

Se realiza resecando completamente el globo ocular o bien a través de una punción del mismo con aguja y jeringa. Muchas veces se remite humor acuoso y no humor vítreo ya que la densidad de éste último hace dificultosa la extracción, por lo tanto debe ponerse atención cuando se envía esta matriz.

No utilizar conservante

Para determinación de Potasio (K) para determinar hora de muerte la muestra no debe estar hemolizada.

PELO

Para análisis de drogas en pelo se cortará un mechón de la zona occipital cercana al cuero cabelludo (importante para estimar el tiempo de consumo), del grosor de un lápiz (aproximadamente 300 a 400 miligramos). Se fijará con cinta adhesiva en papel indicando la zona de a raíz y el extremo.

Cortar también pelo pubiano siguiendo el mismo procedimiento.

Atención: en estudios de comparación morfológica de pelo o estudios para ADN, el pelo deber ser arrancado, debe tener raíz. Enviar al menos 25 pelos de distintos sectores.

Enviar todos los elementos sospechosos cercanos al cadáver como: cucharas, jeringas, medicamentos y otros.

OTROS LÍQUIDOS CORPORALES

La obtención se debe realizar por punción de las cavidades donde estos se encuentran cuidando de no contaminar un líquido con otro (líquido ascítico, de derrame pleural, pericárdico, líquido amniótico, etc.).

Las secreciones más viscosas pueden obtenerse con pipetas.

BIBILOGRAFÍA

-Guía de Toma de Muestra, Conservación, Transporte para Análisis Toxicológicos. Ministerio de Salud Resolución 650/ 2002.

-Guideline for Quality Control in Forensic Toxicological Analyses (2004).Recommendations for sampling postmortem specimens for forensic toxicological analyses and special aspects of a postmortem toxicology investigation G. Skopp, Heidelberg; L. von Meyer, München Members of the Scientific Committee Quality Control.

-Repetto M, Repetto, G. El análisis Químico – Toxicológico-. En: Toxicología Fundamental. Madrid: Editorial Díaz Santo (2009) 4ta Ed. p. 494-519.

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
Acetona	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral en tubo plástico sin cámara de aire. Ambiental: orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	15 días en freezer	Si la muestra no se remite al laboratorio dentro de las 24hs., conservar en freezer	
*Ácido δ-Aminolevulínico urinario	Orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	7 días en heladera a 4°C. No superar pH: 10		
***Ácido fenilglioxílico** (exposición a estireno)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	20 días en heladera a 4°C	Suspender el consumo de gaseosas y cítricos 72hs. antes de la recolección de la muestra	
***Ácido hipúrico** (exposición a tolueno)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	20 días en heladera a 4°C	Suspender el consumo de gaseosas y cítricos 72hs. antes de la recolección de la muestra	
***Ácido mandélico** (exposición a estireno)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	20 días en heladera a 4°C	Suspender el consumo de gaseosas y cítricos 72hs. antes de la recolección de la muestra	

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
***Ácido trans, trans mucónico** (exposición a benceno)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. (recipiente plástico de agua mineral)	4 días en heladera a 4°C (a pH 2 si se guardara más de 4 días)	Suspender el consumo de gaseosas y cítricos 72hs. antes de la recolección de la muestra	
***Arsénico**	Orina (volumen mín. 150ml) de 24hs (recipiente plástico de agua mineral) Pelos: 1g. Uñas: 1g	En heladera a 4°C o en freezer: Indefinido.	Recipiente de plástico limpio con cierre hermético. No se recomienda vidrio	Colorimétrico: Vasak - Sedivec -Absorción atómica: generación de hidruros
***Anticonvulsivantes:** Fenobarbital Fenitoína Ácido valproico Carbamacepina	Suero o plasma heparinizado Vol. Mín.: 1ml	Heladera 4ºC por 5 días		Inmunológico
***Antidepresivos tríclicos**	Suero o plasma heparinizado Vol. Mín: 1ml	Heladera 4ºC por 5 días		Inmunológico
Benzodiacepinas	-Suero o plasma heparinizado. Vol. Mín: 1ml -Orina: única micción cercana al momento de consumo (no antes de 1hs) Vol. Mín: 50ml	Heladera 4ºC por 5 días		Inmunológico

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
Cannabis	Orina: micción única cercana al momento de consumo (no antes de 1hs.) Vol. Mín: 50ml	Heladera 4ºC por 14 días Freezer por 4-5 meses	Recipiente de plástico limpio con cierre hermético	-TLC normalizada -Inmunoló-gico
Cianuro	Sangre entera heparinizada en recipiente de plástico con cierre hermético sin cámara de aire. Vol. Mín: 10ml	Heladera 4°C	Remitir inmediatamente al laboratorio	-Microdifu-sión
***Cloripirifos**	Sangre en jeringa heparinizada Vol. Mín: 5ml	15 días en freezer	Si la muestra no se remite al laboratorio dentro de las 24hs., conservar en freezer	
***Cobre**	-Orina de 24hs. Vol. Mín. 100ml -Sangre entera heparinizada en jeringa descartable sin aguja y tapón plástico. Vol. Mín. 4ml -Suero o plasma heparinizado en tubo plástico tratado con ácido nítrico al 50%, bien enjuagado y tapón plástico. Vol. Mín. 2ml.	Heladera 4ºC por 15 días Freezer indefinida	Recoger en recipiente de plástico tratado con ácido nítrico al 50% por lo menos durante 12hs. El suero o plasma no deben estar hemolizados. Si se recibe sangre entera separar el plasma del paquete globular de inmediato	-Absorción atómica: atomización por llama

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
***Colineste-rasa Eritrocitaria**	Sangre entera heparinizada. En tubo plástico con cierre hermético Vol. Mín. 5ml	Traer al laboratorio dentro de las 6hs. de extraída. Paquete globular inestable	Sin hemólisis	-Método cinético
Colinesterasa Sérica	Suero o plasma heparinizado. Vol. Mín. 1ml.	Heladera 4ºC por 7 días	Es conveniente enviar la muestra inmediatamente al laboratorio	-Método cinético
***Coproporfi-rinas**	Orina de 24hs. en recipiente de plástico de agua mineral Vol. Mín. 100ml	Heladera 4ºC por 7 días	Conservar refrigerado y al abrigo de la luz	
***Cromo**	Vol. Mín. 50ml	Heladera 4ºC Freezer 2 meses	Recoger en recipiente de plástico tratado con ácido nítrico al 50% por lo menos durante 12hs. previo a la recolección de la muestra	Absorción atómica: atomización electrotér-mica
***D-ALA-dehidratasa**	Sangre en jeringa heparinizada. Vol. Mín. 5ml	Remitir al laboratorio dentro de las 2 o 3hs. de extraída la muestra	Nunca colocar en freezer	
***Digoxina**	Suero o plasma heparinizado. Vol. Mín. 1ml.	Heladera 4ºC por 5 días		Inmunoló-gico
Drogas de abuso: -cocaína -anfetaminas -opiáceos -marihuana -barbitúricos -benzodiacepi-nas	Orina: única micción cercana al momento de consumo (no antes de 1hs.).Vol. Mín. para el screening de las seis drogas 150ml. Para la investigación individual 30ml.	Marihuana en freezer 1 semana. Las otras cinco, 5 días en heladera a 4°C	Recipiente de plástico limpio con cierre hermético	-Inmunoló-gico (FPIA) -TLC normalizada

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
***Ferremia**	Sangre en tubo seco de plástico o vidrio tratado con ácido nítrico al 25 o 50% y enjuagar con agua destilada. .nviar el tubo en posición vertical sin centrifugar, tapado con Parafilm o tapón plástico Sangre entera heparinizada en jeringa sin aguja y con tapón plástico.Vol. Mín. 4ml	Suero o plasma : Heladera 4ºC por 7días	Si se recibe sangre entera, separa el plasma del paquete globular de inmediato. **No debe hemolizarse**	-Absorción atómica -Calorimé-trico
***Fenoles** (exposición a benceno)	**Ocupacional:** micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. en recipiente de plástico de agua mineral	1 semana en heladera a 4°C 1 mes en freezer	No se recomienda vidrio	-Colorimé-trico -Cromatogra-fía gaseosa (GLC-FID)
***Hexanodiona** (exposición a n-hexano)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. en recipiente plástico de agua mineral	1 semana en heladera a 4°C 1 mes en freezer		
***1-Hidroxipireno**	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. en recipiente plástico de agua mineral	4 días en heladera a 4°C 2 semanas en freezer	Suspender la ingesta de alimentos ahumados 48hs. antes de la recolección de la muestra	

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
Marcha de psicofármacos (PSF) o investigación individual: -antidepresivos tricíclicos -fenotiazinas -butirofenonas -anfetaminas -carbamacepi-na -opiáceos -barbitúricos -benzodiacepi-nas	Orina: micción única en recipiente de plástico de agua mineral o urocultivo. Vol. Mín. para marcha de PSF 150ml y para investigación individual 50ml.	5 días en heladera a 4°C	Recipiente de plástico limpio con cierre hermético	-Inmunoló-gico -TLC normalizada
***Mercurio**	Orina de 24hs. en recipiente plástico de agua mineral	Indefinido en heladera a 4°C o en freezer	Recipiente de plástico limpio con cierre hermético	-absorción atómica -vapor frío
Metahemoglo bina	Sangre entera heparinizada en tubo plástico con cierre hermético. Para co-oximetría sangre entera heparinizada en jeringa descartable sin aguja y con tapón plástico Vol. Mín. 1ml	Heladera a 4°C	Remitir al laboratorio dentro de las 2hs. de extraída la muestra	-Colorimé-trico -Espectrofo-tométrico -Co-oxímetro
Metanol	Sangre entera (anticoagulante FNa o citrato), suero o plasma en tubo plástico con cierre hermético sin dejar cámara de aire Vol. Mín. 3ml	Remitir refrigerada lo antes posible al laboratorio	Extraer la muestra desinfectando con solución jabonosa, yodo povidona, etc. Sin contenido de alcohol	-Colorimétric o (Williams) -Cromatografí a gaseosa (GC-FID)

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
Monóxido de carbono	Sangre entera heparinizada en tubo plástico con cierre hermético sin dejar cámara de aire. Para co-oximetría, sangre entera heparinizada en jeringa descartable sin aguja y con tapón plástico Vol. Mín. 3ml	3 días en heladera a 4°C	Enviar la muestra inmediatamente al laboratorio	-Microdi-fusión -Espectrofo-tométrico -Co-oxímetro
O-Cresol (exposición a tolueno)	Ocupacional: micción espontánea post-jornada laboral Ambiental: orina de 24hs. en recipiente de plástico de agua mineral	1 semana en heladera a 4°C 1mes en freezer		
Paracetamol o Acetamino-feno	Sangre heparinizada, suero o plasma Vol. Mín. 2ml	Remitir refrigerada lo antes posible al laboratorio	Técnica válida solo para concentraciones tóxicas, no para valores terapéuticos	-Colorimetrí-a. Lui y Oka
PCB's	Sangre en jeringa heparinizada Vol. Mín. 10ml	1 mes en heladera a 4°C 3 meses o más en freezer	Se requiere ayuno no menor de 8hs.	
***Plag. Organoclora-dos**	Sangre en jeringa heparinizada Vol. Mín. 5ml	1 mes en heladera a 4°C 3 meses o más en freezer	Se requiere ayuno no menor de 8hs.	

DETERMI-NACIÓN	MUESTRA Recolección y transporte	ESTABILIDAD	OBSERVA-CIONES	MÉTODO
***Plomo**	**Orina de 24hs**. en recipiente tratado, provisto por el laboratorio **Sangre entera heparinizada** en jeringa descartable, sin aguja y con tapón de plástico Vol. Mín. 6ml	7 días en heladera a 4°C 1 mes en freezer		-Absorción atómica-atomización por llama
Salicilato	Sangre en jeringa heparinizada Vol. Mín. 5ml	7 días en heladera a 4°C	En caso de ingesta única tomar la muestra pasadas las 6hs. Registrar fecha y hora de la extracción	-Colorimé-trico (Trinder) -Inmunoló-gico
***Superwarfar ínicos** (cuantificación: brodifacoum, bromadiolone y difenacoum; investigación cualitativa: warfarina y coumatetralyl)	Suero. Vol. Mín. 4ml Sangre en tubo seco. Vol. Mín. 10ml	3 días en heladera a 4°C Más de 3 o 4 días en freezer		
***Talio**	Orina de 24hs. en recipiente plástico de agua mineral Vol. Mín. 200ml	7 días en heladera a 4°C 1 mes en freezer		-Colorimé-trico -Absorción atómica – atomización por llama
Tiocianatos	Orina: micción única con 3hs. de retención. Vol. Mín. 30ml	15 días en heladera a 4°C o en freezer	Remitir la muestra dentro de las 24hs. de recolectada.	

* Muestras que se derivan

ANEXO III
SELECCIÓN, TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS DE POLIMORFISMOS DEL ADN
GENÉTICA

Se describen a continuación, una serie de recomendaciones y de materiales biológicos habitualmente empleados como muestras de referencia o rastros, que potencialmente podrían constituir evidencias halladas en escenas criminales.

Se entiende por MUESTRAS DE REFERENCIA a aquellas que se obtienen a partir de individuos indubitados, como por ejemplo, la víctima, un sospechoso o bien los participantes de un estudio biológico de parentesco.

Se describen también las posibles etapas de análisis, ya que en muchos casos el procedimiento analítico es totalmente destructivo y una vez que se inicia no se puede recuperar el material en cuestión.

INSTRUCCIONES PARA LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

RECOLECCIÓN DE PERSONAS VIVAS

1-Extracción de muestras de sangre

Las muestras de sangre son el material de elección para estudios de filiación y análisis de muestras de referencia.

Sólo personal biomédico calificado (bioquímicos, médicos, flebotomistas, etc.) podrá colectar las muestras de sangre a partir de donantes que puede obtenerse de dos maneras:

A. Sangre absorbida sobre papel de filtro (forma preferida de recolección)

Actualmente la obtención de muestras sanguíneas se basa en la colección de volúmenes pequeños. La sangre puede tomarse por punción venosa, por punción del talón en caso de bebés, o por punción del pulpejo dactilar de la mano, previa

desinfección con etanol con lanceta estéril. Pocas gotas de sangre alcanzan para la realización de un estudio completo.

- Depositar de 5 a 15 gotas de sangre (aproximadamente 200-500 microlitros en total) sobre papel absorbente/papel de filtro de algodón o similar).
- Dejar secar la sangre en el papel al aire libre de polvo por lo menos durante 1 hora sin exponer a la luz solar.

Importante: El papel de filtro no debe haber sido utilizado previamente para ningún tipo de prueba, debe estar limpio y libre de todo tipo de contaminación biológica de origen humano o de otra especie. Las muestras tomadas a diferentes personas deben ser recolectadas en papeles de filtro separados y rotulados adecuadamente.

B. Sangre anticoagulada en tubo o en jeringa (solo si por razones de fuerza mayor no fuera posible realizar la toma sobre papel de filtro descrita en el ítem A anterior)

- Extraer 5 centímetros cúbicos (mililitros).
- Anticoagular la muestra con EDTA en: tubos *vacutainers* con K_3EDTA, tubos o jeringas de polipropileno conteniendo EDTA 5 %.
- Invertir el tubo o la jeringa suavemente varias veces para homogeneizar la sangre y el anticoagulante.
- Las muestras líquidas tendrán que ser refrigeradas y no congeladas. A tal efecto se recomienda el uso de refrigerantes previos al envío. Embalar los tubos conteniendo sangre líquida en forma individual con espuma de nylon o cilindros de telgopor previamente recubiertos con material absorbente.
- Enviar al Laboratorio tan rápido como sea posible.

Importante: Rotular el continente externo con la leyenda "MANTENER EN LUGAR FRESCO Y SECO, REFRIGERAR AL MOMENTO DE SU RECEPCIÓN, POTENCIALMENTE PELIGROSO".

2-Hisopado bucal

Para tomar la muestra se debe realizar de manera intensa un hisopado de la mucosa yugal empleando para ello hisopos estériles. Con el objeto de asegurar la recolección de cantidades abundantes de este tipo celular, se recomienda utilizar 5 hisopos independientes, los cuales deberán ser frotados por lo menos, durante 60 segundos en la cara interna de la mejilla.

Los hisopos así obtenidos deberán secarse a temperatura ambiente y colocados una vez secos, en sobres de papel nuevos debidamente rotulados.

Esta práctica puede emplearse para obtener material tanto de bebés como de adultos y resulta particularmente útil en los casos en que la extracción de sangre resulte dificultosa o cuando se aduce que el proceso de extracción es invasivo.

- Usar hisopos de algodón estériles.
- Frote la cara interna de la mejilla presionando con delicada firmeza durante al menos un minuto.
- Secar, ensobrar y rotular adecuadamente.
- Los hisopos bucales no necesitan refrigeración.

3-Uñas

En casos donde se sospecha que ha existido contacto violento o lucha, se deben examinar las uñas de la víctima.

- Se recomienda preservar material ungueal y subungueal; para ello se pueden cortar y recoger por separado las uñas de los dedos de ambas manos. En caso de no ser posible, por ejemplo si las uñas son muy cortas, se debe humedecer un hisopo en solución fisiológica estéril y tomar la muestra de la región sub-ungueal.
- Los hisopos deben secarse a temperatura ambiente y ensobrarse en sobres nuevos correctamente rotulados a fin de evitar posibles contaminaciones y/o degradación de las muestras.

Su obtención resulta indolora y si se la preserva adecuadamente podrá conservar valor informativo aún después de varios años.

4-Pelo

Las muestras de pelo constituyen uno de los rastros más habituales en escenas criminales. Debe tenerse en cuenta que al solicitarse el análisis genético en muestras de pelo el mismo es destructivo; por lo cual todo análisis comparativo-estructural deberá ser realizado en forma previa, debiendo registrarse fotográficamente los resultados de las observaciones previas al estudio de ADN.

- Recoger los pelos con sumo cuidado utilizando pinzas estériles para prevenir el daño del bulbo y los tejidos asociados.
- Secar al aire los pelos supuestamente mezclados con fluidos corporales.
- Ensobrar cada grupo de pelos en forma separada en sobres de papel y rotular adecuadamente.
- Enviar lo antes posible al Laboratorio.

RECOLECCIÓN DE MATERIAL CADAVÉRICO

1- Cadáver fresco, sin signos de avanzado estado de putrefacción

A-Tejidos Blandos

- Se debe cortar con bisturí un fragmento de músculo, estriado o liso, los cuales suelen mantener por más tiempo su integridad, de entre 10 y 20 gramos, o de 2 a 4 centímetros cúbicos de músculo, y colocarlos en un frasco nuevo.
- No hay preferencia en cuanto a qué músculo o músculos deben tomarse. Fragmentos de músculos del brazo (bíceps/tríceps) o de la pierna (cuádriceps) pueden ser apropiados.
- Embalar en bolsas de polietileno estériles (tipo Ziploc) o en frascos nuevos/estériles; uno por cada muestra y rotular adecuadamente.

- Enfriar inmediatamente. La temperatura de conservación adecuada es –20º C (freezer) o inferior (-70º C). Si esto no fuese posible debe colocarse el material en congelador de heladera o en heladera y remitirlo al Laboratorio lo antes posible sin interrumpir la cadena de frío.

Importante: No deben seleccionarse tejidos ricos en materia grasa.

B-Material Óseo y piezas dentales

- Se recomienda el empleo de huesos largos y piezas dentales que no exhiban presencia de caries y /o arreglos odontológicos.
- Recoger estos materiales biológicos con manos enguantadas o con la ayuda de una pinza limpia o estéril.
- Colectar 10-15 cm de huesos largos (húmero, fémur o metacarpos y metatarsos).
- Colectar piezas dentales de acuerdo al siguiente orden de prioridades:
  Molar sin caries ni arreglos, premolar sin caries ni arreglos, canino sin caries ni arreglos y dientes delanteros sin caries ni arreglos; molar con arreglo, premolar con arreglo, canino con arreglo y dientes delanteros con arreglo.
- Ubicar las muestras en frascos de plástico nuevo y limpio con cierre hermético y sin el agregado de **ningún fijador** (formol, etc.).
- Si los restos están reducidos y secos, colocarlos en sobres de papel y rotularlos ya que pueden mantenerse a temperatura ambiente.
- Enviar de forma inmediata al Laboratorio.

El material que provenga de exhumaciones debe ser despojado de tejidos musculares y conectivos asociados, debe ser lavado y secado en estufa (37ºC). Una vez lavadas y secas las piezas óseas y dentarias podrán preservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su empleo.

Importante: En forma alternativa, el material cadavérico puede conservarse hasta el momento de su remisión al laboratorio en tubos o frascos conteniendo ClNa sólido (sal). El material preservado mediante este procedimiento no deberá ser congelado en ningún momento.

Los principios subyacentes que aseguran la eficiente conservación del tejido bajo estas condiciones son:

- *La deshidratación determinada por el efecto higroscópico del ClNa.*
- *El incremento de la fuerza iónica.*

Estos efectos disminuyen la actividad de enzimas nucleolíticas (que degradan ADN) y también limitan la actividad microbiana. Además, este tipo de preservación evita los característicos olores del material cadavérico proveniente de los productos de degradación proteica y lipídica. Se facilita también el transporte y conservación de este tipo de muestras.

Cubos de aproximadamente 1 cm de lado, deben ser colocados en tubos de propileno de 50 ml conteniendo aproximadamente 25 gr de sal. Una vez colocado el contenido debe agitarse vigorosamente con el objeto de poner en contacto la muestra con la sal y promover a su deshidratación.

C-Sangre

- Debe realizarse una punción de la cavidad cardíaca.
- Si la sangre aún no se ha coagulado debe agregarse anticoagulante (EDTA 5 %) a la muestra.
- Luego de tomar la muestra se debe rotular los tubos o jeringas con marcador indeleble.
- Si la sangre se ha coagulado al momento de tomar la muestra, deben colocarse los coágulos en tubo de ensayo o frascos de vidrio, rotular correctamente el recipiente con marcador indeleble y conservar a –20º C (freezer) o inferior (-70º C). Si esto no fuese posible debe colocarse el material en congelador de heladera o en heladera y remitirlo al Laboratorio lo antes posible.

D-Pelos

Para que los pelos sean útiles para el análisis de ADN nuclear deben tener la porción del bulbo piloso, condición anagénica. En la misma, el bulbo piloso será muy rico en células nucleadas y por lo tanto es capaz de de aportar cantidad y calidad

suficiente de ADN que permitirá la realización de análisis tanto de marcadores nucleares como mitocondriales. Para ello es necesario arrancar los pelos sin cortarlos.

Los pelos telogénicos son muy abundantes, pero su capacidad informativa resulta muy limitada debido a la falta de células en el bulbo, por lo que sólo permite, en determinadas situaciones, al análisis de ADN mitocondrial.

- Cuando sea posible deben tomarse entre 20 y 30 pelos.
- Colocarlos en sobres de papel nuevo.
- Cerrar y rotular correctamente.

2- Cadáver en estado de putrefacción

Material Óseo/piezas dentales

Se deberá seguir el mismo procedimiento antes detallado en la sección *Cadáveres frescos*, inciso B, Material Óseo y piezas dentales.

El material cadavérico puede conservarse hasta el momento de su remisión al laboratorio en tubos o frascos conteniendo ClNa. El material preservado mediante este procedimiento no deberá ser congelado en ningún momento.

RASTROS Y VESTIGIOS BIOLÓGICOS

Las siguientes instrucciones se recomiendan para la toma de cualquier tipo de mancha biológica (sangre, semen, saliva, otros líquidos biológicos).

1-Manchas Frescas

- Si las manchas aún se hallan en estado líquido las mismas deben ser recolectadas absorbiéndolas cuidadosamente con gasa o hisopo estéril de algodón. Alternativamente puede usarse papel absorbente.
- Las muestras levantadas deben dejarse secar a temperatura ambiente por lo menos durante 1 hora sin exponer a la luz solar.
- Colocar cada muestra en un sobre de papel, perfectamente rotulado.

Importante: nunca colocar en bolsa de nylon, ni colocar muestras de diferentes orígenes en un mismo sobre.

2-Manchas Secas

A-Sangre

La estrategia de recolección dependerá del soporte sobre el cual se encuentre depositado:

- Para el caso de **manchas de sangre sobre individuos y superficies** se recomienda absorber las manchas de sangre seca por aplicación de un hisopo o gasa estériles humedecidos con solución fisiológica.
- Las muestras levantadas deben dejarse secar a temperatura ambiente por lo menos durante 1 hora sin exponer a la luz solar.
- Colocar cada muestra en un sobre de papel, perfectamente rotulado.

- Para supuestas **muestras de sangre en agua o nieve**, proceder con rapidez a fin de evitar mayor dilución de las muestras.
- Remitir la mayor cantidad de nieve o agua.
- Ubicarla en un frasco hermético, congelar, rotular adecuadamente y enviarlo de forma inmediata al Laboratorio.

- En aquellos casos en los que las **manchas se encuentren sobre objetos inmuebles** y los procedimientos antes detallados no puedan llevarse a cabo, levantar la mancha tomando la parte del soporte que la contenga teniendo cuidado de no raspar sobre la misma y tomando la menor cantidad de soporte posible.
- Enviar el fragmento de soporte que contiene la mancha.
- Colocar cada muestra en un sobre de papel, perfectamente rotulado.

- Si la **mancha seca se encuentra sobre algún elemento** que pueda ser enviado al Laboratorio (Por ej.: mancha de sangre en un cuchillo) lo ideal es

remitir el soporte completo, inmovilizándolo, y remitirlo en un sobre de papel, perfectamente rotulado.

B-Semen

- Absorber las manchas de semen seco sospechadas por aplicación de un hisopo o gasa estériles humedecidos con solución fisiológica.
- Las muestras levantadas deben dejarse secar a temperatura ambiente por lo menos durante 1 hora sin exponer a la luz solar.
- Colocar cada muestra en un sobre de papel, perfectamente rotulado.
- Enviar los objetos con manchas secas de semen al Laboratorio en sobres de papel. Envolver la evidencia para evitar la remoción de las manchas por la acción abrasiva del frote durante el transporte. No usar continentes de plástico.
- Cuando sea posible, recortar muestras grandes de las supuestas manchas de semen de objetos inmuebles con instrumentos adecuados afilados.

Importante: nunca colocar en bolsa de nylon, ni colocar muestras de diferentes orígenes en un mismo sobre.

Para evidencias seminales tomadas de víctimas de violación ver *sección Toma de muestra para víctimas de abuso sexual.*

3- Prendas

- Si las manchas están húmedas deben dejarse secar a temperatura ambiente por lo menos durante 1 hora sin exponer a la luz solar.
- Envolver las prendas una vez secas y luego colocarlas en sobres de papel **individuales**, cerrando y rotulando cada sobre con la identificación de cada muestra.
- Resguardar todos los residuos y rastros asociados a las prendas en sobres de papel.

Importante: nunca colocar en bolsa de nylon, ni colocar muestras de diferentes orígenes en un mismo sobre.

4- Pelos

- Recoger los pelos con sumo cuidado utilizando pinzas estériles para prevenir el daño del bulbo y los tejidos asociados.
- Secar al aire los pelos supuestamente mezclados con fluídos corporales.
- Ensobrar cada grupo de pelos en forma separada en sobres de papel y rotular.

5- Víctimas de abusos sexuales

Se procederá a obtener los hisopados bucales, vaginales y anales según la instrucción 002/08, sin perjuicio de la misma, se tendrán en consideración las siguientes recomendaciones.

Tomar dos muestras de la **cavidad oral** pasando por debajo de la lengua, encías y dientes. Ésta es la primera toma que debe realizarse, puesto que en la boca los restos de semen desaparecen con cierta celeridad. Asimismo es oportuno distinguir esta práctica de aquella que se efectúa para obtener una muestra indubitable.

Además se recomienda obtener dos tomas de **exocérvix** , dos tomas **de fondo de saco vaginal**, y dos de **genitales externos**, limpiando cuello uterino, cavidad vaginal y la región vulvar; y dos tomas **anales**, limpiando el conducto ano-rectal y una el margen anal. Si se requieren tomas para análisis de Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) deberán realizarse con posterioridad, para evitar la pérdida de espermatozoides.

En caso que la víctima de agresión sexual fuese un hombre, se recomienda realizar frotis mediante dos hisopados del surco balano prepucial, glande y cuerpo de pene, evitando frotar el meato uretral. Además, según el caso debe evaluarse el hisopado de escroto.

Se pueden detectar rastros de **saliva** durante el examen, habitualmente asociados a huellas de mordeduras. En esta situación se recomienda realizar un hisopado de la zona con hisopos estériles ligeramente humedecidos con solución fisiológica. La posibilidad de análisis genético se vincula con la presencia de células de descamación que se desprenden de los ductos salivales así como de la mucosa bucal. Se debe proceder de la misma manera en caso de encontrar manchas de semen en la superficie corporal.

En casos donde se sospecha que ha existido contacto violento o lucha, se deben examinar las **uñas de la víctima** como se sugirió anteriormente.

En aquellos casos en que se verifique acceso carnal o contacto de región genital, mediante un cuidadoso peinado pubiano es posible recolectar **pelos del agresor**. Es importante recoger los pelos con sumo cuidado utilizando pinzas estériles para prevenir el daño del bulbo. Cada grupo de pelos debe ensobrarse en forma separada. Debe tenerse en cuenta que al solicitarse el análisis genético en muestras de pelo el mismo es destructivo; por lo cual todo análisis comparativo-estructural deberá ser realizado en forma previa, debiendo registrarse fotográficamente los resultados de las observaciones previas al estudio de ADN.

Es frecuente encontrar en la ropa de la víctima elementos o fluidos del agresor que van a ser utilizados como elementos físicos de prueba (pelos, manchas, etc.) y evidencia traza (en baja cantidad o concentración) proveniente de la escena, así como alteraciones que orienten sobre la manera de cómo ocurrieron los hechos (orificios, rupturas, desgarros, salpicaduras, etc.). Si la víctima al momento del examen llevara puesta las mismas prendas de vestir que portaba cuando sucedió el hecho, es necesario conservar las mismas y se le informará al acompañante para que le suministre ropa de cambio. La ropa deberá guardarse en bolsas de papel, por separado con el fin de disminuir el riesgo de posibles contaminaciones y evitar transferencias que deterioren la evidencia.

7- Saliva

Pueden asimismo detectarse rastros de saliva o células de descamación del epitelio bucal en objetos como bordes de vasos, picos de botellas, cepillos de dientes.

8- Orina

La orina contiene células de descamación del tracto urinario. A partir de hisopados de sitios con restos de orina pueden obtenerse muestras potencialmente analizables desde el punto de vista genético.

Cualquier resto de material orgánico hallado que se considere de interés debe ser colocado en frasco nuevo perfectamente cerrado y rotulado. Debe conservarse a –20º C (freezer) ó inferior (-70º C). Si esto no fuese posible debe colocarse el material en congelador de heladera ó en heladera y remitirlo al Laboratorio lo antes posible.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corach D., Sala A., Marino M. Actualización en Técnicas moleculares de Identificación humana. 2005.
2. Corach D. Guía del 16º. Curso de Actualización en técnicas de identificación humana mediante técnicas basadas en ADN. 2012.
3. Instructivo para toma y conservación de muestras para estudio del polimorfismo del ADN. PRICAI, Fundación Favaloro.
4. Manejo de cadáveres en situaciones de desastre. Serie Manuales y Guías sobre Desastres, Nº 5. Área de Preparativos para Situaciones de Emergencia y Socorro en Casos de Desastre, 2004.

ANEXO A

Ejemplo de solicitud de realización de estudio filiación por medio de análisis del polimorfismo molecular del ADN.

Sr. Director del Laboratorio Regional de Investigación Forense

Por medio de la presente solicito la realización del estudio de filiación mediante análisis del polimorfismo molecular del ADN del siguiente grupo humano cuyas muestras remito adjuntas con el objetivo de determinar la existencia o no de vínculo biológico entre el Sr. PÉREZ, JUAN y el Sr. PÉREZ, PEDRO:

1. INTEGRANTE NÚMERO 1

a. APELLIDO Y NOMBRE: PÉREZ, JUAN
b. CONDICIÓN: Titular
c. Tipo de Muestra Remitida: Sangre en papel de filtro
d. Fecha de Extracción de la muestra: 2/07/2012

2. INTEGRANTE NÚMERO 2

a. APELLIDO Y NOMBRE: RODRÍGUEZ, ANA
b. CONDICIÓN: Madre de Integrante 1 (Vínculo Biológico indubitado)
c. Tipo de Muestra Remitida: Sangre anticoagulada en tubo
d. Fecha de Extracción de la muestra: 2/07/2012

3. INTEGRANTE NÚMERO 3
a. APELLIDO Y NOMBRE: PÉREZ, PEDRO
b. CONDICIÓN: Padre Alegado de Integrante 1 (Vínculo Alegado)
c. Tipo de Muestra Remitida: Sangre anticoagulada en tubo
d. Fecha de Extracción de la muestra: 2/07/2012

Fecha de Solicitud:

Firma y Aclaración del Responsable de la solicitud:

ANEXO B

Ejemplo de solicitud de realización de estudio forense por medio de análisis del polimorfismo molecular del ADN.

Sr. Director del Laboratorio Regional de Investigación Forense

Por medio de la presente solicito la realización del estudio del polimorfismo molecular del ADN del material que enumero y describo a continuación con el objetivo de determinar la existencia o no de vínculo biológico entre la muestra número 1 y las muestras número 2, 3 y 4:

1. Muestra de sangre tomada al Sr. .....
Condición: IMPUTADO

2. Mancha de sangre hallada en remera mangas cortas color blanca
Condición: EVIDENCIA

3. Mancha de sangre hallada en sábana azul con estampado floreado
Condición: EVIDENCIA

4. Pelos hallados sobre la mesa de la habitación
Condición: EVIDENCIA

Fecha de Solicitud:

Firma y Aclaración del Responsable de la solicitud:

ANEXO C

MALETÍN PARA LA TOMA DE MUESTRAS

La siguiente es una lista de los materiales recomendados necesarios para realizar la toma de muestras:

- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Frascos de plástico con tapa a rosca.
- Bolsas de polietileno con cierre hermético
- Papel absorbente/de filtro de algodón
- Jeringas (1cc, 5cc, 10cc, 20cc.)
- Agujas
- Lazo
- EDTA 5%
- Hisopos estériles
- Tubos de ensayo estériles
- Gradilla
- Sobres de papel (diferentes tamaños)
- Sobres acolchados
- Barbijos
- Camisolines
- Máscaras para vapores orgánicos
- Guantes de goma
- Guantes de látex
- Alcohol
- Algodón
- Marcador Indeleble
- Lapicera
- Etiquetas
- Tela adhesiva
- Herramientas: Martillo, Cierra, Pinzas, Bisturí, Tijera
- Cámara fotográfica

ANEXO D

ACTA DE CONFORMIDAD

Sea cual fuere el tipo de muestra de referencia que se tome, el procedimiento deberá estar acompañado por la firma de un Acta de Conformidad. El material genético de cada individuo es único y privado.

ACTA DE CONFORMIDAD

Autos caratulados:
Lugar y fecha:

Por la presente, los abajo firmantes dan su entera conformidad para la realización del estudio de polimorfismos genéticos de carácter identificatorio, así como para la extracción de muestras de sangre adicionales, en caso de resultar insuficiente la tomada en esta oprtunidad.

FOTO

NOMBRE Y APELLIDO: DÍGITO PULGAR DERECHO

D.N.I:

FECHA DE NACIMIENTO:

DOMICILIO:

Encontrándose presente el Sr. Defensor, Dr…….....…

……

TESTIGO:

1)……D.N.I Nº:……

con domicilio en……..

2)……D.N.I Nº:……

con domicilio en……..

Profesional que efectuó la extracción de la muestra……..…

…….para el servicio de ……..…

El informe podrá ser retirado únicamente por las partes intervinientes.

TOMA DE MUESTRAS

MUESTRAS OBTENIDAS DE INDIVIDUOS VIVOS

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	ESTUDIO	PROCEDIMIENTO
SANGRE	2 papeles de filtro o 6 hisopos	Filiación o evidencia (elección)	Extraer sangre por punción del pulpejo dactilar de la mano, talón o punción venosa. Depositar 5-15 gotas en cada tarjeta. Dejar secar, rotular adecuadamente y ensobrar.
	Anticoagulada en tubo o jeringa	Filiación o evidencia	5 ml en tubo con EDTA. Refrigerar la muestra para su envío.
HISOPADO BUCAL	5 hisopos	Filiación	Frotar cada hisopo, con fuerza y girando por la cara interna de la mejilla por 60 segundos. Dejar secar y ensobrar.
UÑAS DE MANO	Todas las posibles	Evidencia	Cortar el extremo distal libre de las uñas de cada mano. Colectar todos los residuos que de ellas puedan desprenderse. Colocar en un sobre por cada mano.
	1 hisopo por cada mano del borde libre ungueal	Evidencia	En el caso de que las uñas estén cortas, deberá frotarse el borde de las mismas con un hisopo embebido en solución fisiológica estéril. Dejar secar, rotular a que mano corresponden y ensobrar.
PELOS		Evidencia	Tomar con pinza estéril y prevenir el daño del bulbo. Secar al aire si contienen fluidos corporales. Ensobrar cada grupo de pelos en sobre separados.
HISOPADO BUCAL	2 hisopos	Evidencia de abuso sexual	Frotar por debajo de la lengua, encías y dientes. Dejar secar y ensobrar.
HISOPADO VAGINAL	6 hisopos	Evidencia de abuso sexual	Obtener dos tomas de exocérvix, dos tomas de fondo de saco vaginal, y dos de genitales externos, limpiando cuello uterino, cavidad

			vaginal y la región vulvar. Si se requieren tomas para análisis de Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) deberán realizarse con posterioridad, para evitar la pérdida de espermatozoides.
HISOPADO ANAL	4 hisopos	Evidencia de abuso sexual	Obtener dos tomas anales, limpiando el conducto ano-rectal y dos del margen anal.
HISOPADO DE PENE	2 hisopos	Evidencia de abuso sexual	Tomar dos hisopados del surco balano prepucial, glande y cuerpo de pene, evitando frotar el meato uretral.
HISOPADO DE MORDEDURAS	2 hisopos	Evidencia	Humedecer los hisopos con solución fisiológica estéril y hacer un barrido con cada uno por los bordes y el interior de la mordedura, aclarando el sitio de la toma.

TOMA DE MUESTRAS

MUESTRAS OBTENIDAS DE CADÁVERES

TIPO DE MUESTRA	ESTUDIO	PROCEDIMIENTO
TEJIDOS BLANDOS	Evidencia	No extraer de cadáver putrefacto Tomar preferentemente tejido muscular estriado o liso sin grasa. Cortar 2 a 4 cc del músculo (10-20 gr). Preservar con sal (*), o congelar a -20°C o -70°C, sin sal y asegurando cadena de frío durante el envío.
HUESOS	Evidencia	Tomar preferentemente huesos largos (fémur, húmero, metacarpos y/o metatarsos). Trabajar en lo posible con doble guante. Eliminar todo el tejido muscular y conectivo asociado, con un bisturí. Colocar en el recipiente adecuado y/o preservar con sal (*).
PIEZAS DENTALES	Evidencia	Colectar estas piezas según el siguiente orden de prioridades: molar, premolar, canino, dientes delanteros. Extraer todas las piezas dentales posibles,

		que no exhiban caries ni arreglos odontológicos. Colocar en el recipiente adecuado y/o preservar con sal (*).
UÑAS DE LA MANO	Evidencia 1 hisopo por cada mano del borde libre ungueal	<u>De cadáver no putrefacto</u> Cortar el extremo distal libre de las uñas de cada mano. Colectar todos los residuos que de ellas puedan desprenderse. Colocar en un sobre por cada mano. En el caso de que las uñas estén cortas, deberá frotarse el borde de las mismas con un hisopo embebido en solución fisiológica estéril. Dejar secar, rotular a que mano corresponden y ensobrar.
SANGRE	Evidencia	Realizar punción de la cavidad cardíaca y colectar en tubos con EDTA al 5 %. Si la sangre se ha coagulado al momento de tomar la muestra, deben colocarse los coágulos en tubo de ensayo o frascos de vidrio, rotular correctamente el recipiente y conservar a –20° C o -70° C.
PELOS	Evidencia	Arrancar 20-30 pelos, previniendo el daño del bulbo y ensobrar.

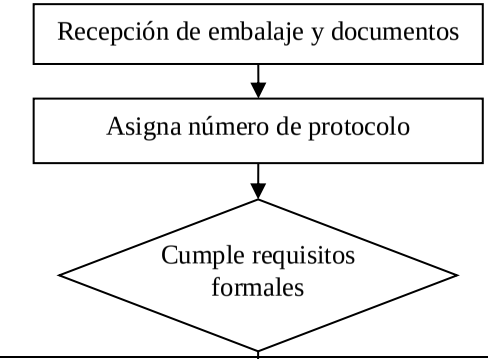
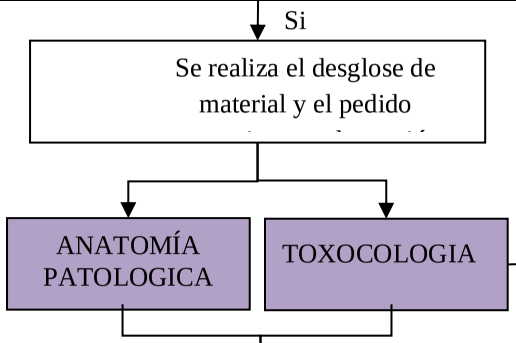
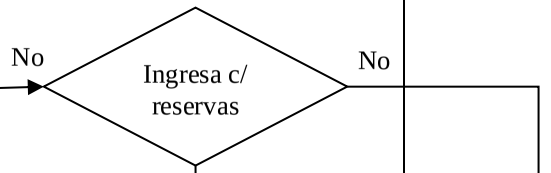
(*) *En forma alternativa, el material cadavérico puede conservarse hasta el momento de su remisión al laboratorio en tubos o frascos conteniendo ClNa sólido (sal). El material preservado mediante este procedimiento no deberá ser congelado en ningún momento. Cubos de muestra de aproximadamente 1 cm de lado, deben ser colocados en tubos de propileno de 50 ml conteniendo aproximadamente 25 gr de sal. Una vez colocado el contenido debe agitarse vigorosamente con el objeto de poner en contacto la muestra con la sal y promover a su deshidratación.*

TOMA DE MUESTRAS

MUESTRAS DE RASTROS Y VESTIGIOS BIOLÓGICOS

TIPO DE MUESTRA	ESTUDIO	PROCEDIMIENTO
Manchas de sangre o	Evidencia	<u>Sobre individuos</u> Para manchas húmedas o frescas: absorber con hisopos estériles.

semen		Para manchas secas: absorber con hisopos estériles humedecidos con solución fisiológica o agua destilada estéril. Sobre objetos o elementos transportables (prendas, ropa de cama, toallas, cuchillo, etc.). Remitir el soporte completo, inmovilizándolo, y en un sobre de papel perfectamente rotulado. Sobre elementos no transportables (colchón, alfombra, cortinas, etc.). Cortar o descoser la porción que tenga mancha. Sobre elementos inmuebles (pared, suelo, automóvil, muebles, etc.). Absorber con hisopos estériles, girando sobre la mancha y en caso de que las manchas estén secas, humedecer previamente los hisopos con solución fisiológica estéril. Si los procedimientos antes detallados no puedan llevarse a cabo, levantar la mancha tomando la parte del soporte que la contenga teniendo cuidado de no raspar sobre la misma y tomando la menor cantidad de soporte posible.
Saliva	Evidencia	Sobre objetos (colillas de cigarrillo, bordes de vasos, latas y botellas, solapas de sobres, etc.). Recolectar los objetos sospechados de contener saliva, con guantes o pinza y embalar por separado.
Orina	Evidencia	Se aconseja recoger con una pipeta plástica en un recipiente estéril con tapa a rosca. Conservar en heladera, a -20°C o -70°C hasta el envío preservando la cadena de frío.

ANEXO IV	CIRCUITO PARA RECEPCIÓN DE MUESTRAS Y EVALUACIÓN FORMAL		
Descripción de Tareas / Departamento	**MESA DE ENTRADAS**	**PROFESIONAL CORRESPONDIENTE**	
1. El auxiliar administrativo o el prosecretario, recibe el embalaje con la documentación respaldatoria y registra el ingreso en el libro de Registros de Ingresos y en el sistema. Evalúa la documentación y el estado general del envío.			
2. El profesional correspondiente evalúa si el incumplimiento permite el ingreso de las muestras con reservas otorgando el estado de "Aceptado con Reservas". Se le asigna el estado de "Rechazado" a los envíos que no cumplan con requisitos obligatorios y son derivados al médico patólogo.			
3. El profesional correspondiente da ingreso con reservas			
4. El profesional correspondiente da por rechazado el envío			
5. El profesional correspondiente o el prosecretario da ingreso al envío			

ANEXO V

MANUAL DE PROCEDIMIENTO TÉCNICO
PATOLOGÍA

Las muestras que ingresan en el Laboratorio de Investigación Forense, pueden ser de carácter histológico (tejidos/muestra macroscópica) o citológico (líquido orgánico o Punción Aspirativa con Aguja Fina).

A continuación se describirá el circuito que recorre un material al entrar en el sector de histopatología.

1. **Material histológico**

   a. Se realiza la descripción macroscópica, que consiste en:
      - toma de dimensiones
      - toma de peso
      - descripción de la forma
      - descripción del color
      - presencia de eventuales alteraciones
      - toma de fotografías

   b. En base a lo referido en el ítem a., se selecciona la muestra a procesar, la cual se incluye en un cassette ad hoc.
      El material remanente pasa a reserva protocolizada.

   c. *Deshidratación e inclusión en parafina*. La muestra incluida en los cassettes se ingresa al procesador automático de tejidos marca Leica TP1020, en el cual pasará por los siguientes componentes líquidos, con el fin de deshidratar los tejidos, reemplazar el agua por parafina y dar solidez al tejido en el momento del corte en el micrótomo:
      - Formol 10% durante 1.30hs.
      - Alcohol 70% durante 1.30hs.
      - Alcohol 70% durante 1.30hs.

- Alcohol 96% durante 1.30hs.
- Alcohol 96% durante 1.30hs.
- Alcohol 100% durante 1.30hs.
- Alcohol 100% durante 1.30hs.
- Alcohol 100% durante 1.30hs.
- Tolueno o aclarante aromatizado durante 1.30hs.
- Tolueno o aclarante aromatizado durante 1.30hs.
- Parafina histológica durante 1.30hs.
- Parafina histológica durante 1.30hs.

d. *Preparación del taco histológico.* Los tejidos se colocan en moldes de inclusión y se agrega parafina líquida por medio del dispenser marca Leica EG1120.

   Se procede a la correcta orientación de la muestra y se enfría para su solidificación en la placa de enfriamiento, marca Leica EG1150C.

   Se extrae la muestra del molde y se la coloca en un molde plástico para inclusión, con la consiguiente formación del taco.

e. *Realización de cortes histológicos.* Se utilizará para este fin el micrótomo de rotación Leica RM2125. Dicho corte se aplica a un portaobjeto.

f. *Coloración*. Se siguen los siguientes pasos:
   - se desparafina con Tolueno o aclarante aromatizado
   - se hidrata con:
     - Alcohol 100%
     - Alcohol 100%
     - Alcohol 100%
     - Alcohol 96%
     - Alcohol 96%
     - Alcohol 70%
     - Alcohol 70%

- se colorea con hematoxilina
- se lava con agua
- se realiza el viraje en ácido clorhídrico y agua
- se contracolorea con eosina
- se enjuaga
- se deshidrata nuevamente en:
    - Alcohol 70%
    - Alcohol 70%
    - Alcohol 96%
    - Alcohol 96%
    - Alcohol 100%
    - Alcohol 100%
    - Alcohol 100%
- se aclara con Tolueno
- se monta con bálsamo sintético y se coloca un cubreobjetos.

g. Pasa a la sala de microscopía para su estudio y la elaboración del informe.

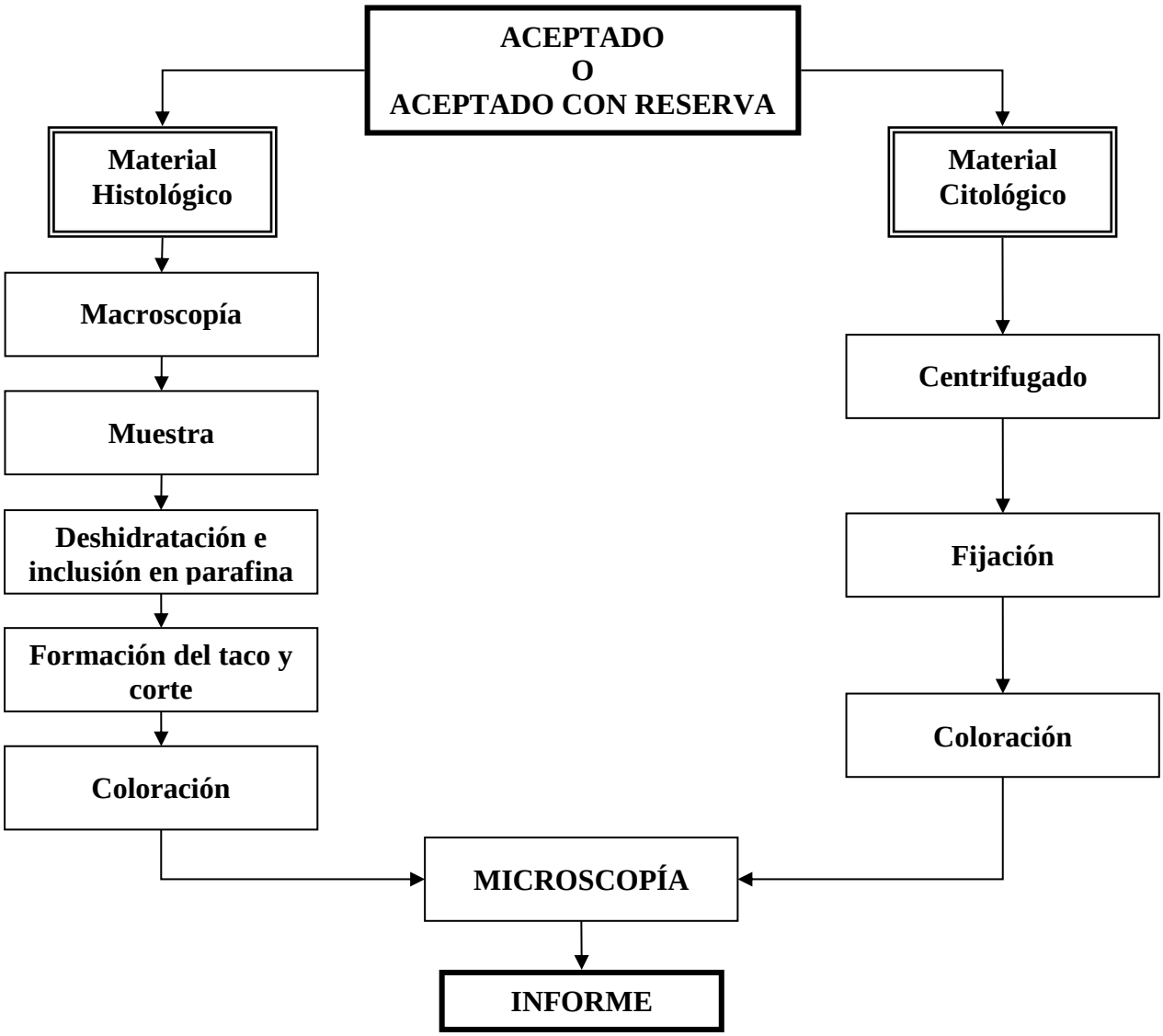
2. Material Citológico

Tratándose de líquido se procede a centrifugar con la Centrífuga 80-2B para la concentración de las células, con el objetivo de facilitar su estudio.

Una vez centrifugado, el sedimento se extiende en un portaobjetos, se fija con alcohol 96% y se procede a realizar la coloración y el montaje, según los pasos descriptos en el punto 1.f.

Luego, al igual que con el material histológico, pasa a la sala de microscopía para su estudio y se elabora el informe.

Según la necesidad de estudios, el Laboratorio de Investigación Forense, cuenta con el equipamiento para realizar coloraciones diferenciales: Tricrómico de Masson, Pas, Ziehl Nilsen, entre otras.


ACEPTADO
O
ACEPTADO CON RESERVA
Material Histológico
Material Citológico
Macroscopía
Muestra
Deshidratación e inclusión en parafina
Formación del taco y corte
Coloración
Centrifugado
Fijación
Coloración
MICROSCOPÍA
INFORME

ANEXO VI

MANUAL DE PROCEDIMIENTO TÉCNICO
TOXICOLOGÍA

Las muestras que ingresan al Gabinete de Toxicología Forense pueden ser Biológicas y no Biológicas.

El material a peritar es transportado del sector de Mesa de Entrada al sector Toxicología o bien reservado en las heladeras o freezers dispuestos para su conservación (de acuerdo a la naturaleza de los materiales a analizar). El material permanece en la Sección hasta que la pericia se finalice.

Muestreo

En primera instancia se describe el material de acuerdo a su naturaleza y se toman muestras representativas para análisis.

Paralelamente, se van completando los datos correspondientes en los libros internos de la Sección. Estos registros escritos servirán posteriormente para la confección del informe Pericial. La ventaja que poseen estos cuadernos periciales es, principalmente, la posibilidad de tomar notas que sean importantes para el desarrollo analítico de las muestras que no se pueden consignar en un informe por ser subjetivas o de presunción sin certezas y de eventualmente reconstruir todo lo actuado en la pericia.

En ellos se consignan los datos tales como sumario y/o causa, dependencia interventora, Fiscal, nombre del/los imputado/s y damnificado/s, y descripción del material recibido.

Durante este procedimiento se describe

a) tipo y condiciones en las que fue remitido el contenedor

b) envoltorios y material que se halló en el interior del/los mismo/s y todos aquellos datos que resulten de interés pericial. Acto seguido, se procede a guardar el material remanente de la pericia en su/s envoltorio/s original/es y se introducen en la/s bolsa/s o el/los sobre/s original/es

c) en el caso de que el continente (envase, vaso, botella, etc.) no presente contenido aparente, el mismo se lava con solventes adecuados y se reserva el extracto para su posterior análisis.

A continuación se describirá la secuencia de análisis para identificar grupos de tóxicos en muestras de orina, sangre, contenido estomacal, Humor Vítreo y residuos de la escena (comprimidos o soluciones sospechosas encontradas) y manchas de sangre, semen etc.

Tener en cuenta que el aislamiento de los compuestos toxicológicamente relevantes de la matriz biológica es esencial para su éxito en la detección e identificación en la sistemática del análisis toxicológico.

El siguiente esquema sobre la preparación y para el análisis toxicológico de muestras biológicas proporciona una orientación para el pre-tratamiento y extracción del xenobiótico de la muestra a analizar. Debido a la gran cantidad de compuestos toxicológicamente relevantes, no hay una sistemática estándar, por lo tanto los diferentes procedimientos descriptos a continuación son complementarios y orientativos. Estos procedimientos se pueden ejecutar en paralelo o en secuencia, y de acuerdo al caso y de acuerdo a las muestras remitidas, se decidirá la forma en que se debe aplicar la siguiente sistemática.

1- ANÁLISIS DE ORINA, SANGRE, LÍQUIDO PERICÁRDICO, HUMOR VÍTREO.

Esquema de trabajo:

1.1- Examen físico

1.2- Determinación de alcoholes

Analizar la presencia de alcohol etílico y metílico sobre distintos tipos de muestras (sangre, orina, humor vítreo, otros).

En primera instancia se describe el material de acuerdo a su naturaleza y se toman muestras representativas para análisis (0,5 ml del fluido a analizar).Paralelamente se va completando los datos correspondientes en el libro interno del Área. En él se consignan los datos tales como causa, dependencia interventora, nombre del imputado, peso, altura, hora del hecho, hora de la extracción de las muestras, nombre del médico legista que realizó la extracción de las muestras y material recibido.

- Cuantificación de Alcohol por microdifusión **(Anexo A)**

- Cuantificación de etanol por método cinético **(Anexo B)**
- Cuantificación de alcohol por cromatografía gaseosa **(Anexo C)**

1.3-Tests inmunológicos

1.3-1-. ORINA

Se realizan sin un aislamiento previo del analito de interés.

En caso positivo, confirmación

- **Método confirmatorio: HPTLC**

Para cocaína se efectúan extracciones en columnas SPE (extracción en fase sólida) del material remitido. Con el eluído obtenido se realizar una cromatografía en capa delgada de Silicagel G de alta resolución (HPTLC) con indicador de fluorescencia. Solvente de corrida: metanol (10mL)- amoníaco (0.15mL). Luego de extraerlo del líquido resolutivo, revelar **(Anexo D).**

Para THC se realiza el **Método de Meatherall y Garriott.**

Hidrólisis alcalina seguida de extracción líquida/líquida. Con el residuo obtenido, luego de la evaporación del solvente, se realiza una cromatografía en capa delgada de Silicagel G de alta resolución (HPTLC) con indicador de fluorescencia. Solvente de corrida: n-heptano - n-butanol ácido - acético glacial. Luego de extraerlo, del líquido resolutivo, se procede a revelar **(Anexo E).**

1.4- Determinación de Monóxido de Carbono (Anexo F)

1.5- Determinación del Ion Cianuro (Anexo G)

1.6- Determinación de Ácido Acetil Salicílico (AASS) (Anexo H)

1.7- Determinación de Pseudocolinesterasa Plasmática (Anexo I)

1.8- Sangre, humor vítreo, líquido pericárdico

Extracción con acetonitrilo y/o acetona

Extracción SPE **(Anexo J)**

HPTLC con testigos indubitables

En caso positivo CGM, HPLC (derivar)

1.9- Determinación de Alcaloides (Anexo K)

2- ANÁLISIS DE CONTENIDO ESTOMACAL, VISCERAS Y RESIDUOS DE LA ESCENA

2.1- Aislamiento y extracción.

Una vez descartada la presencia del Ion cianuro, sobre una alícuota del material recibido, se efectúan las siguientes determinaciones:

a) Acidificación de la muestra con ácido clorhídrico en el caso de muestras líquidas o ácido tartárico en el caso de muestras sólidas.

- Se realizan extracciones con éter de petróleo. Los extractos obtenidos se colocan en un mismo recipiente y se lleva a sequedad en un Baño María.
- Con la misma muestra se realizan tres extracciones con éter etílico.

b) Alcalinización de la muestra y se efectúan dos extracciones con éter etílico, y una con cloroformo. Para muestras complejas se efectúan una purificación mediante cambio de pH con ácido sulfúrico y extracciones con éter etílico y cloroformo.

En el caso de los líquidos de lavado y raspado de vestigios, no se efectúa el proceso de extracción procediéndose directamente al corrimiento cromatográfico descripto en el siguiente punto.

Fase sólida (SPE)

Este sistema de extracción nos permite trabajar con pequeñas cantidades de muestras y solvente, tiene una alta capacidad para remover interferencias y sus extractos podrían ser utilizados sin realizar clean-up en métodos confirmatorios como cromatografía gaseosa-espectrofotometría de masa (GC-MS). No hay formación de emulsiones.

Identificaciones

Efectuado el aislamiento se procede a identificar los tóxicos orgánicos fijos:

- Métodos cromatográficos. Cromatografía en capa delgada (HPTLC).
- Métodos espectrofotométricos (Absorción al UV).

Métodos Cromatográficos

Con los extractos obtenidos se efectúan corrimientos cromatográficos en capa delgada de silicagel de alta resolución (HPTLC) utilizando distintos solventes de corridas (metanol-amoniaco, cloroformo - acetona, etc.) y luego de un revelado secuencial, diferenciado y específico, con distintos revelantes tales como solución de difenilamina, iodoplatinato, naftoquinonsulfonato de sodio, solución de cloruro de paladio, etc., se investiga la presencia de:

- **Extracto ácido de éter de petróleo**: plaguicidas organoclorados, plaguicidas organofosforados, carbamatos, etc.
- **Extracto ácido de éter etílico**: barbitúricos, plaguicidas, carbamatos, algunos analgésicos, etc.
- **Extracto alcalino de éter etílico—cloroformo**: alcaloides, benzodiacepinas, fenotiacinas, tricíclicos, anestésicos locales, etc.

Análisis de placas Cromatográficas:

Una vez reveladas las placas cromatográficas, se observa la presencia de máculas y se compara color y RF (altura de la macula en la Placa) de las muestra/s con las de los testigos específicos sembrados en la misma placa.

Se deja constancia que lo expuesto anteriormente posibilita una investigación general de los posibles tóxicos presentes en la muestra es decir, identifica familias de sustancias. Una vez reconocida la familia, se realizan extracciones, corrimientos cromatográficos, revelados y reacciones específicas con el fin de identificar el compuesto en forma individual.

Confirmación: CGM, HPLC

Espectrofotometría UV

El análisis de UV es conveniente para detectar una droga específica o confirmar compuestos detectados por otras técnicas. Se realiza un barrido espectral entre 390 y 220 nm en solución acuosa ácida (HCL 1% o Ácido sulfúrico 0,1N) para extracto alcalino, en solución acuosa alcalina (Hidróxido de amonio 0,45N) para extracto ácido o en solución neutra (metanol). De esta forma se obtiene información adicional mediante el estudio de los

picos de absorción máxima ya que muchas drogas varían su absorción al UV (λ máxima) por cambio de pH.

El barrido UV es poco específico a menos que la droga problema sea aislada por otro procedimiento como CCD (cromatografía en capa delgada preparativa, elución) o por metodologías que reducen las interferencias espectrales de los líquidos orgánicos y de otras drogas.

Algunos compuestos pueden presentar espectro UV similares o superpuestos requiriendo otras técnicas de confirmación.

3. BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Glucosa

Urea

Proteínas

Creatinina

CPK, CPKMB, LDH

4. ANÁLISIS DE SANGRE, ESPERMA, PELOS

4.1 Determinación de sangre

Luego de descrito el material a analizar se toma una pequeña porción de la mancha sospechosa y sobre la misma se realiza la reacción de bencidina/acética y agua oxigenada.

Determinaciones de especie

Tipificación

4.2 Determinación de semen

- Examen descriptivo del material
- Ubicación y delimitación de las manchas
- Investigación de elementos formes: presencia de espermatozoides
  Coloración May Grunwald-Giemsa
- Analítica de los componentes del plasma seminal
- Determinación de "fosfatasa ácida prostática"
- Antígeno Prostático

- Cromatografía en Placa

4.3 Determinación de pelos

La muestra del pelo en estudio debe ser incluida en un porta objeto con Bálsamo de Canadá y después observada en el microscopio para establecer si se trata de pelo humano o animal. Se observa al microscopio las características morfológicas para determinar su naturaleza como: punta, tallo, médula, canal medular, bulbo, adherencias, índice medular, índice escamoso, tipo y longitud.

Para determinar la región de donde proviene el pelo, se toma en consideración la longitud, el diámetro, la forma de la punta, el material que cubre la superficie y la forma de la sección transversal.

Las diferencias principales entre pelo humano y animal se observan principalmente en el canal medular, médula y corteza.

5. ELABORACIÓN DEL INFORME

Anexo A

ETANOL

DETERMINACIÓN POR MICRODIFUSIÓN

Objetivo

Describir la metodología a utilizar para la determinación de alcohol etílico en diferentes fluidos y matrices empleando la técnica de microdifusión.

Muestras: sangre entera, plasma, suero, humor vítreo, orina, homogeneizado de tejido.

En el caso de sangre, usar sangre entera, de preferencia con fluoruro de sodio como anticoagulante. También puede usarse heparina o EDTA. Puede usarse suero o plasma, pero sus valores representarán 1,18 veces los valores de la sangre total.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico: Se pesan 3,75 gr de dicromato de potasio y se disuelven en 150 ml de agua destilada, calentando si fuera necesario. A continuación se agregan 280 ml de ácido sulfúrico concentrado en forma lenta y agitando continuamente. Durante esta operación se mantiene refrigerado el recipiente. Una vez adquirida la temperatura ambiente se completa a un volumen de 650 ml con agua destilada.

Solución saturada de Carbonato de potasio: Se pesan 112 g de carbonato de potasio anhidro y se disuelven en agua destilada. Dejar a temperatura ambiente y llevar a un volumen de 100 ml.

SOLUCIÓN TESTIGOS

A partir de

1) **Solución Madre de alcohol:** Se prepara una solución al 1% en peso de etanol, midiendo 1,27 ml de alcohol absoluto o 1,34 ml de alcohol 95º y se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Soluciones de los testigos: Preparar a partir de la solución madre testigos conteniendo, 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 g /l

2) **Alcohol etílico 99,5 % P.A y una densidad de 0,79 g/l**.

- 3.0 g/l /l tomar 1,9 ml de alcohol etílico 99,5% P.A y llevar a 500 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada dicha solución fraccionarla en viales de 20 ml almacenar para su posterior utilización.
- 2.0 g/l /l tomar 1,3 ml de alcohol etílico 99,5% P.A y llevar a 500 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada dicha solución fraccionarla en viales de 20 ml almacenar para su posterior utilización.
- 1.0 g/l tomar 0,6 ml de alcohol etílico 99,5% P.A y llevar a 500 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada dicha solución fraccionarla en viales de 20 ml almacenar para su posterior utilización.

Cálculos realizados para la determinación de volúmenes a partir de alcohol absoluto 99,5 P.A con una densidad de 0,79 g/l marca:

Para 3* g/l:

Concentración inicial de etanol: 790 g/l

Concentración final de etanol: 3 g/l

Volumen final: 500 ml

Volumen inicial: $\frac{\text{Concentración final} * \text{Volumen final}}{\text{Concentración inicial}}$ = **1.9 ml**

Para 2* g/l:

Concentración inicial de etanol: 790 g/l

Concentración final de etanol: 4 g/l

Volumen final: 500 ml

Volumen inicial: $\frac{\text{Concentración final} * \text{Volumen final}}{\text{Concentración inicial}}$ = **1.3 ml**

Para 1* g/l:

Concentración inicial de etanol: 790 g/l

Concentración final de etanol: 1 g/l

Volumen final: 500 ml

Volumen inicial: Concentración final* Volumen final= **0.6 ml**
Concentración inicial

Procedimiento: En cámara de Conway colocar en el compartimento interno 2 ml de solución de dicromato de potasio en medio ácido. En el compartimento externo colocar 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio como agente liberante. Colocar la tapa esmerilada lubricada hasta cerrar parcialmente y depositar en el otro extremo del compartimento externo 1 ml de sangre/orina/humor vitreo/plasma/suero o 4 ml de tejido homogeneizado. Cerrar e imprimir un movimiento rotatorio sobre una superficie plana, a fin de mezclar la muestra con el reactivo liberante. Es importante colocar la solución de carbonato de potasio en el lado opuesto al que se halla la muestra de sangre sin que tomen contacto hasta que la cámara este perfectamente tapada. Si se mezclaran antes de tapar, comenzaría la liberación de alcohol de inmediato y se cometería error por defecto.

Proceder de forma similar en otra cámara de Conway colocando 1 ml de testigo en lugar de la muestra.

Dejar difundir a 37°C durante 24 horas.

La reacción de óxido reducción del etanol con el dicromato de potasio (Naranja), dará como producto final un compuesto color verde.

$3\ C_2H_5OH + 2\ K_2Cr_2O7 + 8\ H_2SO_4$ ---------- $3\ CH_3COOH + 2Cr\ (SO4)_3 + 2\ K_2SO_4 + 11\ H_2O$

Una vez cumplido el tiempo de difusión, trasvasar el contenido del compartimento interno en forma cuantitativa, luego enjuagar el mismo con 2 ml de agua destilada y recolectar dicho volumen en el mismo tubo y mezclar por inversión.

Preparar un blanco de reacción en tubo graduado de 10 ml, colocando 2 ml de solución sulfúrica de dicromato de potasio, agregar 2 ml de agua destilada y mezclar por inversión.
Leer en espectrofotómetro a 600 nm llevando a cero con agua destilada.

O también puede realizarse una curva de calibración con testigos de concentraciones conocidas crecientes de etanol y calcular el valor en la muestra a partir de la curva obtenida.

Observaciones. La presencia de acetaldehído o alcohol isopropílico da lugar a reacciones similares con formación de ácido acético y acetona respectivamente, con la consiguiente reducción del dicromato de potasio.

La posibilidad de que ocurran estas reacciones le restan especificidad al método, siendo por ello conveniente informar los resultados de las determinaciones como **"contenido en sustancias reductoras volátiles"**. Ante la sospecha de estar frente a una intoxicación por otro alcohol o sustancias reductoras deben efectuares previamente reacciones de identificación de estos compuestos mediante reacciones específicas.

$$F = \frac{\text{Concentración del testigo}}{\text{Abs. del blanco} - \text{Abs. del testigo}}$$

$$\text{mg de volátiles reductores/100 ml} = (\text{Abs. del blanco} - \text{Abs. de la muestra}) \times F$$

Anexo B

ALCOHOL ETÍLICO

Método Cinético

Uso

Test enzimático in vitro para la determinación fotométrica cuantitativa de la concentración de alcohol etílico en suero, plasma, sangre entera, orina y otras matrices.

Significado Clínico

Las determinaciones de alcohol etílico son las más requeridas en los laboratorios de toxicología clínica y forense. Las mediciones de alcohol etílico son usadas en el diagnóstico y tratamiento de intoxicación o envenenamiento por alcohol.

Mientras hay publicaciones sobre procedimientos aceptados, incluida la cromatografía gaseosa y métodos osmométricos, la técnica enzimática descripta basada en la información de Buecher und Redetzki[2], es específica.

Fundamento del Método

Ensayo enzimático UV.

Alcohol etílico y NAD son convertidos en acetaldehído y NADH por el alcohol deshidrogenasa (ADH). El NADH formado durante la reacción, se mide fotométricamente y la velocidad en el cambio de la absorción, es directamente proporcional a la concentración de alcohol etílico.

Valores

0,2 a 0,30 g/l: Alteraciones que afectan la percepción de los sentidos y una disminución de los reflejos. Euforia incoordinación leve

0,3 a 0,99 g/l: Confusión, desinhibición emocional, ataxia moderada

1,0 a 1,5 g/l: Perdida de la inhibición y perdida del autocontrol con parálisis progresiva de los procesos mentales más complejos.

1,5 a 3,0 g/l: Temblor, confusión mental, incoordinación motriz

3,0 a 4,00 g/l: Depresión neurológica severa, disartria muy marcada, hipotermia, convulsiones, pupilas midriáticas, Coma

Reactivos no provistos

Ácido tricloroacético (10% w/v) para desproteinización de sangre entera

Toma de muestra y preparacion[4,5]

No usar alcohol u otros desinfectantes volátiles en el sitio de venopunción. Puede usarse: cloruro de benzalconio, Merthiolate acuoso (timerosal) o povidona yodada.

Suero / plasma

Recolectar suero tubos estándar de muestra.

Plasma heparinizado, EDTA o fluoruro de potasio / oxalato de potasio.

Sangre entera

Usar sangre entera recolectada con una mezcla de fluoruro de sodio / oxalato de potasio como anticoagulante.

Sangre entera debe ser desproteinizada por el siguiente procedimiento antes del ensayo

Pipetear en un tubo de microcentrífuga de polipropileno:

Ácido Tricloroacético (10% w/v; **frío**)
300 µl

Muestra de sangre entera 300 µl

Tapar herméticamente, homogeneizar la suspensión en un mixer de vibración (Vortex) y centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante debe ser claro. Transferir el sobrenadante en un frasco limpio para muestras para el análisis. No exponer al aire por más de 5 minutos. Multiplicar la sangre entera sobrenadante por 1.848 para corregir la dilución.

No dejar la muestra, el calibrador o los recipientes de control de calidad abiertos por más de 5 minutos. Los resultados pueden ser afectados.

Almacenamiento: las muestras deben ser bien cerradas y refrigeradas (2-8°C).

Concentración de la solución de trabajo

1 Buffer

Buffer, conservantes

2 NAD/ADH

NAD ≥ 3mmol/l; ADH ≥ 37 U/l; estabilizadores; conservantes

Control de calidad

Precical Alcohol etílico 100mg/dl calibrador, Cat. No. 1775804

Precitrol Alcohol etílico control bajo, Cat. No. 1775812

Precitrol alcohol etílico control alto, Cat. No. 1775782

Ácido tricloroacético (10% w/v) para desproteinización de sangre entera.

Manejo de los reactivos

R1: listo para usar

R2: listo para usar

Componentes del kit cerrado: hasta la fecha de expiración conservar a 2-8°C.

Llevar las soluciones de reactivo a la temperatura de ensayo antes de su uso.

Estabilidad de las soluciones de reactivo: 90 días a 2-8°C.

Procedimiento

Longitud de onda: 340nm

Cubeta: 1 cm trayectoria de luz

Temperatura: 37°C

Medida contra el aire (aumento de absorbancia)

Un standard es suficiente para cada serie de ensayo. Usar el calibrador Precical alcohol etílico y tratar como la muestra.

Pipetear en tubos de ensayo:
Solución de reactivo R1 500µl
Solución de reactivo R2

500µl
Mezclar e incubar por 5 minutos a 37°C. Añadir
Muestra de Percical® Alcohol etílico 100 µl
Mezclar y verter en la cubeta del fotómetro

Leer la primer absorbancia A_1 después de 1 minuto y comenzar el cronómetro al mismo tiempo. Leer A_2 exactamente 1 minuto después.

$A_2 - A_1 = \Delta A_{simple}$ o $\Delta A_{standard}$

Usar los resultados de la absorbancia para el cálculo.

Cálculo

Usando standard

$C\ [g/l] = \Delta A_{simple} \times C_{Precical® Alcohol etílico} / \Delta A_{Precical® Alcohol etílico}$

Rango de medición

20-450 mg/dl

Diluir las muestras con concentraciones más altas usando 0.9% ClNa y re analizar. Usar la muestra original para dilución y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Nota

No usar solventes volátiles en el área de trabajo cuando se realicen los ensayos.

Anexo C

DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETILICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA CON MUESTREADOR HEADSPACE G1888

Describir la metodología a usar para la determinación de alcohol etílico en diferentes fluidos empleando la técnica de Cromatografía Gaseosa.

Muestras: sangre entera, plasma, suero, humor vítreo, orina, homogeneizado de tejido.

En el caso de sangre, usar sangre entera, de preferencia con fluoruro de sodio como anticoagulante. También puede usarse heparina o EDTA. Puede usarse suero o plasma, pero sus valores representarán 1,18 veces los valores de la sangre total.

Fundamentos

El análisis de alcohol en sangre o fluidos biológicos es una determinación ampliamente utilizada, de alto rendimiento en las aplicaciones de laboratorios forenses. El muestreo uso o estático del Headspace tiene muchas ventajas bien conocidas para la determinación de volátiles en una variedad menor de matrices ideales. La sangre u otros fluidos biológicos no son ciertamente la más limpias de las matrices por lo tanto es muy adecuado el muestreo con Headspace. En términos de análisis de GC algunas de las ventajas del muestreador automatizado Headspace incluye un inyección reducida y mantenimiento de la columna para mejor cuantificación, preparación de muestras limitada y un mayor rendimiento. El muestreador Headspace G1888 cuenta con una entrada de flujo completamente inerte, uniformemente calefaccionado y la línea de ventilación única con capacidad de purga. Cuando se toma en conjunto estos atributos conducen a una reducción del arrastre con repetitividad mejorada**.**

Condiciones operativas Instrumentales

a. Cromatógrafo gaseoso Marca Agilent Technologies Modelo: 7820A GC System
b. Detector FID: Hidrogeno a 30ml/min
c. Columna de alta resolución para cromatografía gaseosa Marca: Agilent Technologies Modelo:
d. Muestreador Automático Network Headspace Marca Agilent Technologies Modelo: 1888. Temperatura de operacional 5 minutos

Preparación de reactivos

Drogas y solventes

Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan con normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

a. Alcohol Etílico 99,5% P.A.
b. Alcohol n- Butílico 99,5% P.A

Solución Madre de alcohol: Se prepara una solución al 1% en peso de etanol, midiendo 1,27 ml de alcohol absoluto o 1,34 ml de alcohol 95º y se lleva a un volumen de 100 ml con agua destilada. Concentración 10 g/l.

Soluciones de los testigos: Preparar a partir de la solución madre testigos conteniendo, 5,0; 3,0; 2,0 y 1,0 y 0,5 g/l.

Soluciones estándares para preparación de curva de calibración a partir de Alcohol Etílico 10 g/l:

- 5,0 g/l: Tomar 50 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada y analizada dicha solución, almacenarla en refrigerador para su posterior utilización.
- 3,0 g/L: Tomar 30 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada y analizada dicha solución, almacenarla en refrigerador para su posterior utilización.
- 2,0 g/L: Tomar 20 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada y analizada dicha solución, almacenarla en refrigerador para su posterior utilización.
- 1,0 g/L: Tomar 10 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada y analizada dicha solución, almacenarla en refrigerador para su posterior utilización.
- 0,5 g/L: Tomar 5 ml de la solución madre y llevar a 100 ml con agua destilada. Luego de homogeneizada y analizada dicha solución, almacenarla en refrigerador para su posterior utilización

Rotular los frascos e incluir la fecha de preparación

Procedimiento

Procesar las muestras por duplicado.

Respetar el orden en que se agregan los reactivos.

Tomar una alícuota de muestra de 0,5 ml utilizando micro pipeta automática y colocar en vial de 10 ml, desechar tip utilizado para el pipeteo en recipiente correspondiente, adicionar en el mismo vial una alícuota de 0.5 ml de Alcohol n- butílico utilizado como estándar interno, cerrar vial utilizando Crimper, 20mm Seals Agilent Technologies. Repetir dicho paso con todas y cada una de las muestras para análisis teniendo la precaución de evitar el contacto con la piel u otra parte e cuerpo.

Identificar viales con la concentración utilizada para realizar curva de calibración; colocar alícuotas de 0,5 ml utilizando micropipeta automática en cada uno de los viales correspondientes.

Anexo D.1

DROGAS DE ABUSO EN ORINA

Confirmación por CG o CG/MS

CLEAN SCREEN® DAU

1. Preparar la muestra

   Para un muestra de orina de 5mL, agregar 2mL de 0.1M buffer fosfato, pH 6.0

   El pH de la muestra debe ser 5.5 – 6.5

2. Preparar Clean Screen® DAU (CSDAU131)

   2 x 1 mL metanol

   2 x 1 mL D.I. H_2O

   1 x 1 mL 0.1 M buffer fosfato, pH 6.0 (no dejar que la columna se seque)

3. Aplicar la muestra a la columna

   Colocar una columna en el equipo de vacío

   Añadir la muestra a la columna

   Dejar fluir la muestra con un flujo de 1-2 mL/minuto

4. Lavar la columna

   1 x1 mL 0.1 M buffer fosfato, pH 6.0

   1 x 0.5 mL 1.0 N ácido acético

5. Secar la columna

   5 minutos en la bomba de vacío (15-20 pulgadas de Hg)

6. Lavar la columna

   1 x 1 mL hexano

7. Eluir drogas ácidas y neutras

   4 x 1 mL cloruro de metileno

   Elusión seca bajo atmosfera nitrógeno y temperatura menor a 40°C

8. Inyectar el ácido y drogas neutras

Reconstituir con 100 µL de acetato de etilo

Inyectar 1-2 µL en el CG o CG/MS

9. Lavar la columna

1 x 1 mL metanol

10. Eluir drogas básicas

2 x 1 uL metanol básico (2% hidróxido de amonio en metanol)

11. Extraer e inyectar drogas básicas

Añadir 3 mL de agua deionizada seguido de 200-300 µL de cloroformo

Poner en Vortex por 15 segundos, y permitir que las capas se separen

Anexo D.2

COCAINA Y BENZOILECGONINA EN ORINA

CLEEN SCREEN® DAU

Confirmación con HPTC, CG o CG/MS

1. Preparar la muestra

Para 5 mL de orina, añadir 0,5 mL 0,2 N ácido sulfúrico (*el pH de la muestra debe ser entre 2.0 y 5.0)*

2. Preparar la columna Clean Screen® DAU (130mg)

2 x 1mL de metanol

2 x 1mL agua destilada

NO DEJAR QUE LA COLUMNA SE SEQUE

3. Aplicar la muestra a la columna

Colocar una columna en el equipo de vacío

Añadir la muestra al depósito

Dejar fluir la muestra con un flujo de 1-2 mL/minuto

4. Lavar la columna

1 x 1mL agua destilada

1 x 1mL N HCl (secar durante 1-2 minutos)

2 x 1mL metanol (secar durante 1-2 minutos)

5. Eluir la cocaína y la benzoilecgonina

2 x 1mL elusión solvente

(Cloruro de metileno: isopropanol (8:2) con 2% NH_4OH)

6. Derivatizado

Secar la elusión en nitrógeno

Asegurarse que todo el agua sea removida

Añadir 50-100 µL BSTFA (con 1% TMCS)

Purgar con nitrógeno

Reactivar con 60-70°C por 15 minutos

7. Inyectar

Inyectar 1-2 µL de la solución remanente

Monitorear los iones seleccionados

Cocaína: 182, 198, 272 y 303 amu, Benzoilecgonina: 240, 256, 346 y 361 amu

Anexo E

MÉTODO DE MEATHERALL Y GARRIOTT

Colocar 5ml de orina en un tubo de centrífuga de 15 ml. Adicionar 0.5ml de solución de NaOH. Llevar el tubo a baño de agua (50-60°C) por 15 minutos. Después del enfriamiento, acidificar con 1ml de HCl 1N. Adicionar 5ml de n-hexano y colocar los tubos en agitación mecánica suave por 20 minutos. Centrifugar a 1000g por 5minutos. Transferir el solvente con ayuda de una pipeta Pasteur para un tubo de ensayo pequeño, y evaporar a temperatura ambiente, con ayuda de corriente de aire seco. Después de la evaporación del solvente, resuspender el residuo con 3-4 gotas de mezcla de cloroformo:metanol 3:1 y transferir cuantitativamente para las placas de HPTLC.

Eluir la placa en el sistema solvente n-heptano-n-butanol-ácido acético glacial (90:9:1) después de la saturación en la cuba, lo que ocurre en 15 minutos. Lugar de aplicación del residuo: 1cm de la extremidad de la placa; ruta de la fase móvil: 7.5cm a partir del punto de siembra. Dejar la placa secando a temperatura ambiente. Nebulizar con dietilamina y, en lo sucesivo, con solución de Fast Blue BB 0.1% en H_2O:McOH. Esperar 10 minutos y observar la placa. Nebulizar, nuevamente, con dietilamina.

Valor de referencia de THC: 0,34.

Anexo F

DETERMINACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO
TÉCNICA DE FELDSTEIN-KLENDSHOJ
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

1. Objetivo

Describir la metodología a usar para la determinación de Monóxido de Carbono en sangre empleando la técnica de Feldestein-Klendshoj para un método espectrofotométrico.

2. Alcance

Este protocolo es aplicable para la determinación de Monóxido de Carbono en sangre empleando un método espectrofotométrico.

3. Desarrollo

3.1 Fundamentos

La Técnica se basa en el comportamiento químico del monóxido de carbono como reductor presente en sangre como carboxihemoglobina sobre el paladio (II), en forma de cloruro de paladio, transformándolo en paladio (0).

La propiedad reductora del monóxido de carbono se interpreta químicamente como:

$$CO + Pd^{++} + H_2O \rightarrow CO_2 + Pd^0 + 2H^+$$

Posteriormente el exceso de sal de paladio (II) origina con el ión ioduro el siguiente complejo:

$$Pd^{++} + 4I^- \rightarrow [I_4\ Pd^{-2}]$$

del que se determina su densidad óptica a 500nm.

Dado que el complejo tiene tendencia a precipitar es necesario agregarle como coloide protector, goma arábiga.

Valores fisiológicos: *Producción endógena: menor a 0,65% de saturación Hb total

Valores de referencia: **No fumadores: 1,0-2,0% de saturación de Hb total

**Fumadores: 5,0-6,0% de saturación de Hb total

Poisoning and Toxicology Handbook, 1996-1997.
Baselt R.C (2000) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in man. Pág 133-135
ACGIH (1991-1992) Industrial Chemical Exposure, Laurwerys, 244, 1993.
Albiano, N.F. (2003) Gases asfixiantes químicos (sección 4- Cap. 13) en Toxicología Laboral, Ed. Superintendencia de Riesgos del Trabajo, BsAs.

3.2 Instrumental - Material utilizado

e. Cámara de Conway.
f. Tubos cónicos de centrífuga.
g. Matraces de 10 ml.
h. Pipetas automáticas de volumen regulable de 10-100 µl, 100-1000 µl y 1000-5000 µl.
i. Pipetas Pasteur.
j. Centrífuga.
k. Equipo de espectrofotometría marca Perkin Elmer Lambda 25 UV/visible.

3.3 Reactivos

Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan con normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

Todos los reactivos se deben almacenar en recipientes adecuados, provistos de etiquetas indicando el nombre del reactivo, fecha de preparación e iniciales del analista.

3.3.1 Drogas y solventes

c. Agua destilada
d. Cloruro de paladio
e. Ácido clorhídrico
f. Ácido sulfúrico
g. Goma arábiga
h. Yoduro de potasio

3.4 Muestreo y conservación

a. Muestra: sangre entera (anticoagulante: heparina, EDTA, Oxalato con Fluoruro de Sodio).

b. Conservación: de 2-8ºC cuando no se realice el análisis en forma inmediata o a -20°C.

c. Volumen mínimo: 5 (cinco) ml de sangre.

3.5 Procedimiento analítico

a. Preparación de reactivos

1. Cloruro de paladio 0,01 N: disolver 0,222 gramos de Cl_2 Pd en 100 ml de HCl 0,01 N, calentando si fuera necesario hasta su disolución total. Completar a 250 ml una vez que la solución esté fría con el mismo ácido.
2. Ácido clorhídrico 0,01 N: tomar 0,21 ml de HCl concentrado 37% y llevar a 250 ml con agua destilada.
3. Ácido sulfúrico 10%: tomar 50 ml de agua destilada, agregar 10 ml de H_2SO_4 concentrado y llevar a 100 ml con agua destilada.
4. Goma arábiga 0,1 % P/V: disolver 0,1 gramos de goma arábiga en 100 ml de agua destilada.
5. Yoduro de potasio 15% P/V: disolver 1,5 gramos de yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada. Preparación reciente.

Rotular los frascos e incluir la fecha de preparación.

Determinación

1. Procesar las muestras por duplicado.
2. Respetar el orden en que se agregan los reactivos.
3. Agregar al compartimiento interno de la Cámara de Conway 2,0 ml de Cl_2 Pd 0,01 N.
4. Agregar al compartimiento externo de la Cámara de Conway 1,0 ml de sangre.
5. Agregar al compartimiento externo de la Cámara de Conway 1,0 ml de H_2SO_4 10%.
6. Cerrar inmediatamente, mezclar con movimientos circulares suaves.
7. Dejar difundir a temperatura ambiente o colocar en estufa de 37°C.
8. Con una pipeta Pasteur se extrae la solución del compartimento interno (paladio metálico y exceso de sal de Paladio) y se coloca en un tubo de centrífuga..
9. Centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm para separar todo el precipitado de paladio.

10. Tomar del sobrenadante 0,1 ml con pipeta Automática de volumen regulable de 10 a 100 uL y transferir a un matraz aforado de 10 ml.
11. Paralelamente realizar un blanco colocando 0,1ml de Cl_2Pd 0,01 N en un matraz aforado de 10 ml.
12. Procesar el blanco por duplicado.
13. Agregar a cada matraz 1 ml de goma arábiga 0,1%. Mezclar bien.
14. Agregar a cada matraz 1,0 ml de yoduro de potasio al 15%. Mezclar bien.
15. Llevar a volumen con agua destilada.
16. Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 500 nm, llevando a cero con agua destilada.

Cálculos

$$\% \text{ de saturación de la Hb total} = \frac{D_B - D_M \times 27{,}75 \times 0{,}8 \times 100}{D_B \times \text{Hb mtra} \times 1{,}34}$$

D_B: densidad óptica del blanco.

D_M: densidad óptica de la muestra.

27,75: 0,05335 x 0,26 x 2 x10 x 100

0,05335: cantidad de cloruro de paladio contenida en 0,1 ml de la solución del reactivo.

La solución reactiva es 0,01 N (0,222 gr. de cloruro de paladio en 250 ml de vehículo) que corresponde, por lo tanto, a 0,888 gr/l.

$$\frac{177{,}61 \times 0{,}01}{2} = 0{,}888$$

A su vez, 177,61 gr. que es el peso molecular del cloruro de paladio, contiene 106,7 mg. de paladio metálico, que corresponde a 0,5335 mg/ml de solución reactiva 0,01N. De acuerdo a la reacción redox antes especificada, cada mol de paladio reducido por un mol de monóxido de carbono, es decir que 177,6 mg de cloruro de paladio son reducidos por 28 mg. de monóxido de carbono. Por lo tanto, 0,26 es el factor de transformación para expresar miligramos de paladio en miligramos de monóxido de carbono.

0,26: factor de conversión de miligramos de Pd^{++} a miligramos de CO.

2: factor de dilución del compartimiento interno

10: dilución de la muestra

100: para referirlo a 100 ml de sangre.

0,8: para referirlo a ml % de CO

1,34: cantidad de CO que fija 1g de Hb.

Hb mtra: hemoglobina de la muestra.

Ejemplo

En una determinación practicada en una muestra de sangre de un sujeto fallecido por inhalación de CO se hallaron los siguientes datos:

Ad = 0,086

Ab = 0,165

Para expresarlo en ml % se aplica el factor 0,8 que resulta de la ecuación que sigue:

28 mg de CO .....22,4 ml (0ªC - 760 mm)

1 mg. de CO ..... 0,8 ml

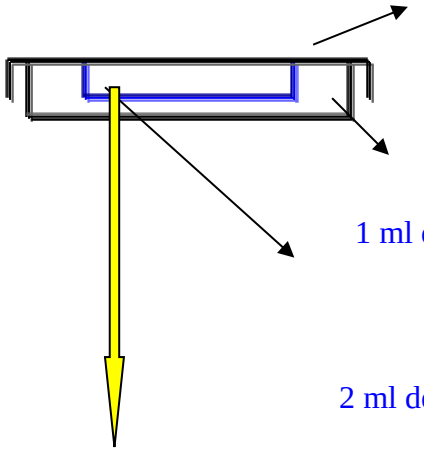
ml de CO = mg % CO x 0,8 ml o sea: 13,32 x 0,8 = 10,66

Para expresar el resultado en porcentaje de saturación (porcentaje de saturación de la hemoglobina) es necesario conocer el tenor de la hemoglobina. En el caso citado la muestra de sangre acusó un tenor de 13 gramos % de hemoglobina.

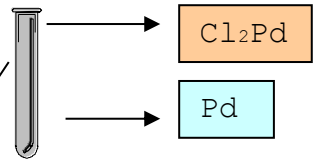
Como 1 gr. de hemoglobina fijan 1,34 ml. de CO

13 gr. de hemoglobina fijarán .....13 x 1,34 = 17,42

- **COLOCAR**



- **EXTRAER** con pipeta la mayor cantidad posible del compartimiento interno. Colocar en tubo de centrifuga.
- **CENTRIFUGAR**



- **COLOCAR**

Matraz 10 ml **DESCONOCIDO**

Matraz 10 ml **BLANCO**

0.1 ml Cl_2Pd	**0.1 Ml Cl_2Pd solucion original**
1 ml goma arabiga	**1 ml goma arabiga**
1 ml IK	**1 ml IK**

- **COMPLETAR A 10 ML CON AGUA DESTILADA**
- Leer en 490 nm frente a agua destilada
- **Cálculos**

1. $$X = \frac{Ab - Ad}{Ab} \times 27{,}75 = \text{mg\% CO}$$

2.

mg CO x 0,8 ml = ml CO

como 1 gr Hb se combina con 1.34 ml de CO

Hb Paciente x 1.34 → 100 % de saturación

ml CO encontrados → x %de saturación de CO

EJEMPLO

En una determinación practicada en una muestra de sangre de un sujeto fallecido por inhalación de CO se hallaron los siguientes datos:

Ad = 0,086

Ab = 0,165

$$\mathbf{X = \frac{Ab - Ad}{Ab} \times 27{,}75 = \frac{0{,}165 - 0{,}086}{0{,}165} \times 27{,}75 = 13{,}3\ mg\%\ CO}$$

Para expresarlo en ml % se aplica el factor 0,8 que resulta de la ecuación que sigue:

28 mg de CO .....22,4 ml (0ªC - 760 mm)

1 mg. de CO ..... 0,8 ml

ml de CO = mg % CO x 0,8 ml o sea : 13,3 x 0,8 = **10,66 ml CO**

Para expresar el resultado en porcentaje de saturación (porcentaje de saturación de la hemoglobina) es necesario conocer el tenor de la hemoglobina. En el caso citado la muestra de sangre acusó un tenor de 13 gramos % de hemoglobina.

Como 1 gr. de hemoglobina fijan 1,34 ml. de CO

13 gr. de hemoglobina fijarán .....13 x 1,34 = 17,42

17,42 ---------- 100%

$$10{,}66 \text{ ---------- } \frac{10{,}66 \times 100}{17{,}42} = 61{,}2\%$$

60 - 70 - Letal, si no se trata con rapidez.

3.6 Bibliografía

a. Guatelli, M. (1971) Intoxicación oxicarbonada. Estudio bioquímico y metodología analítica. Editorial EUDEBA, Buenos Aires, Argentina, Capítulo XII, pp: 89-92.
b. Iovine-Selva. (1979) El laboratorio en la clínica, 2da edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Capítulo 17, pp: 1013-1015
c. College of American Pathologists (1985). Clinical Laboratory Handbook for Patient preparation & Specimen Handling. Fascicle IV. Therapeutic Drug Monitoring/ Toxicology. Carbon Monoxide, blood.

Anexo G

DETERMINACIÓN DE CIANUROS Y ÁCIDO CIANHÍDRICO

En una unidad Conway conveniente preparada colocar en el compartimiento interno 1 ml de HONa 1N y en el compartimiento externo 2 ml de sangre (puede adaptarse al método utilizando en lugar de sangre 1 a 2 gr de macerado de tejido.

Cubrir la cámara con la tapa dejando únicamente el lugar necesario para agregar 1 ml de SO4H2 al 10 % al compartimiento externo. Una vez agregado el sulfúrico tapar inmediatamente y mezclar con cuidado.

Dejar en reposo por 24 hs en estufa a 37 °C.

Reacción de Azul de Prusia

A 1ml del contenido del compartimiento interno agregar 4 a 5 gotas de solución acuosa de sulfato ferroso 2 % recientemente preparado- Calentar suavemente hasta que el precipitado original de Hidróxido Ferroso de color verde se transforma en pardo de Hidróxido Férrico. Enfriar y acidificar con ácido clorhídrico puro hasta disolución de Hidróxido Férrico. En caso de haber cianuro aparecerá un color o precipitado azul. En ausencia del él aparecerá un color amarillo débil característico del ión férrico.

Sensibilidad de la reacción

Es suficiente que el ion cianuro este en proporción 1: 10000.

Pruebas preliminares (papeles reactivos)

Se llevan a cabo antes de la destilación, para obtener una orientación sobre la naturaleza del proceso.

Consisten en suspender las tiras reactivas en el frasco si rozar con las paredes ni con la muestra, sujetándolas con el tapón.

La reacción suele ser rápida, pero aún se puede acelerar calentando suavemente el frasco o añadiendo algunas gotas de cloroformo.

<u>Material</u>

1. Frascos de aproximadamente 100 ml con tapón.

2. Varillas de vidrio.
3. Tiras de papel de filtro

Papel de Schonbein

Muestra

Vísceras, contenido gástrico, líquido, etc. Trituradas y emulsionadas con agua.

Reactivos

1. Ácido tartárico.
2. Resina de guayaco al 10% en alcohol.
3. Sulfato de cobre al 1%

Técnica

1. Colocar la muestra finamente molida en el frasco y acidificar añadiendo ácido tartárico. Mezclar.
2. Sumergir las tiras de papel en la solución alcohólica de resina de guayaco, y volver a impregnar en sulfato de cobre al 1%.
3. Colocar las tiras en el frasco y tapar.
4. En presencia de vapores de CNH el papel vira intensamente a color azul o verde; si la reacción es lenta carece de valor, pues el papel reactivo tiende a oxidarse espontáneamente, aunque con lentitud.

Papel picrosódico de Guignard

Muestra

Muy útil para comprobación de material cianogenético en vegetales. También se puede utilizar sobre las muestras anteriormente citadas.

Reactivos

1. Ácido pícrico al 1%
2. Carbonato sódico al 10%
   (ambas soluciones se conservan indefinidamente)
3. Cloroformo

4. Ácido sulfúrico

Técnica

1. Preparar el papel picrosódico sumergiendo la tira de papel de filtro en ácido pícrico al 1%; secar entre dos papeles de filtro e impregnar con el carbonato sódico al 10%. El papel seco es útil durante pocos días, si se mantiene en la oscuridad.
2. Aplastar el vegetal sospechoso o el contenido ruminal y colocarlo en agua en un tubo de ensayo o matraz que pueda ser tapado con tapón.
3. Añadir unas gotas de cloroformo y ácido sulfúrico para acelerar la autolisis.
4. Suspender las tiras de papel en el frasco.
5. Calentar a 30-35°
6. La aparición de un color rojo ladrillo indica la presencia de cianuro. Un color bien marcado en pocos minutos es significativo. Una reacción ligera en una o varias horas no tiene gran valor.

Anexo H

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO EN ORINA, SUERO Y PLASMA MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Prueba para Salicilatos en orina

A 5 ml de orina hervida y acidificada agregar algunas gotas de solución de $FeCl_3$ al 5% en agua destilada. Un color violeta indica la presencia de un compuesto fenólico en la orina.

Esta prueba es muy sensible y su positividad no indica intoxicación por salicilatos sino que esa persona ha ingerido algún compuesto que lo contenía. En cambio, el ácido Acetilsalicílico y los salicilatos de metilo del contenido estomacal y residuos de la escena deben ser hidrolizados antes que el análisis sea desarrollado para que reaccionen con los iones férricos. La salicilamida es sólo detectable después de la hidrólisis incluso en muestras de orina.-

Hidrólisis

Se requiere de hidrólisis previa para identificar el ácido acetilsalicílico o salicilato de metilo en contenido estomacal y residuos de la escena, para salicilamida en orina, contenido estomacal y residuos de la escena. Primero hervir 1 ml de muestra con 1 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico (0,1 mol/l) durante 10 minutos, enfriar, filtrar si fuera necesario, y entonces neutralizar con 1 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio (0,1 mol/l).

Resultados

Un color violeta fuerte indica la presencia de salicilatos. Los preservantes azidas reaccionan fuertemente con este test y pueden dar reacciones falsas positivas en orina conteniendo altas concentraciones de cetonas (cuerpos cetónicos). Esta prueba es sensible y detecta dosis terapéutica con ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, 4-aminosalicílico, metilsalicilato y salicilamida.-

Sensibilidad

Salicilato, 10 mg/l.

DETERMINACIÓN DE SALICILEMIA

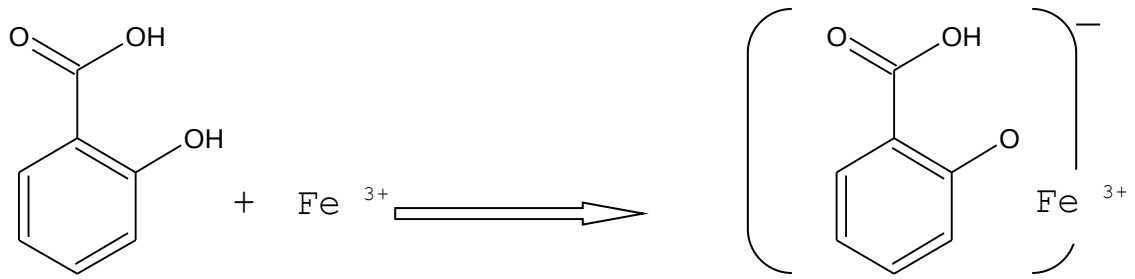
Describir la metodología a usar para la determinación de Ácido Acetil Salicílico en sangre o plasma empleando un método espectrofotométrico.

1. DESARROLLO

1.1 Fundamento

En presencia de sales férricas los salicilatos forman un complejo de color violeta cuya absorbancia es función de la concentración de salicilato presente en la muestra.

Este complejo resultante se mide en espectrofotómetro a 510nm.



Ácido Salicílico **Complejo color Violeta**

Rango terapéutico: *Analgésico: menor a 10mg/dl.

*Anti-inflamatorio: 15 a 25mg/dl.

*Poisoning and Toxicology Handbook. 2°Edition, 1996-97. Pág. 1347.

1.2 Reactivos

Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan con normas internacionales de calidad (ACS, ISO).

Todos los reactivos se deben almacenar en recipientes adecuados, provistos de etiquetas indicando el nombre del reactivo, fecha de preparación e iniciales del analista.

1.3 Drogas y solventes

a. Agua destilada
b. Cloruro de Mercúrico
c. Nitrato férrico nanohidratado
d. Droga patrón de salicilato de sodio
e. Ácido clorhídrico
f. Cloroformo

1.4 Muestreo y conservación

a. Muestra: Orina, Suero o plasma (se puede emplear cualquier anticoagulante).
b. Conservación: 2-8ºC.
c. Volumen mínimo: 1,5 ml.

1.5 Procedimiento analítico

a. Preparación de reactivos

1. Solución Stock de Salicilato de Sodio: (100 mg de ión Salicilato por 100 ml). Disolver 580 mg de la Cloruro de sodio en agua destilada y se completa luego a 500 ml. Conservar mediante el agregado de unas gotas de cloroformo y mantener a 4^{o}C.
2. Ácido Clorhídrico 1N: En probeta colocar 100ml de agua destilada, agregar 10 ml de HCl concentrado (12N) y completar a volumen final de 120 ml con agua destilada.
3. Reactivo de Trinder: Disolver por calentamiento 40 g de Cloruro Mercúrico en 800ml de agua destilada; una vez frío agregar 120 ml de Ácido Clorhídrico 1N y 40 g de Nitrato Férrico.

Cuando el Nitrato Férrico se haya disuelto llevar a un litro con agua destilada.

Conservar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

El reactivo es estable a temperatura ambiente por tiempo indeterminado.

Rotular los frascos con fecha de preparación, fecha de vencimiento y operador.

b. Preparación de la curva de calibración

- Solución Stock de Salicilato de Sodio: (100 mg de ión Salicilato por 100 ml). Disolver 580 mg de la Cloruro de sodio en agua destilada y se completa luego a 500 ml. Conservar mediante el agregado de unas gotas de cloroformo y mantener a 4^{o}C.
- Soluciones testigos de ión Salicilato: (15, 25, 40, 60 y 75 mg por 100 ml)

- T15: Tomar 15 ml de la solución Stock y llevar a 100 ml con agua destilada
- T25: Tomar 25 ml de la solución Stock y llevar a 100 ml con agua destilada
- T40: Tomar 40 ml de la solución Stock y llevar a 100 ml con agua destilada
- T60: Tomar 60 ml de la solución Stock y llevar a 100 ml con agua destilada
- T75: Tomar 75 ml de la solución Stock y llevar a 100 ml con agua destilada

Estas soluciones se conservan de la misma manera que la solución Stock.

Vortexear los tubos durante 15 segundos.

Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 510 nm, llevando a cero con agua destilada.

c. Procesamiento de las muestras

1. Procesar las muestras por duplicado.
2. Respetar el orden en que se agregan los reactivos.
3. En tubo Falcon colocar 0,5 ml de muestra y agregar 2,5 ml de Reactivo de Trinder.
4. Vortexear 30 segundos.
5. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.
6. Trasvasar el sobrenadante a otro tubo de ensayo.
7. Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 510 nm, llevando a cero con agua destilada.

1.6 Cálculos

No se debe restar el blanco a la lectura de las muestras ni a las lecturas de los testigos. El valor del Blanco se utiliza como punto en la curva de calibración.

El valor de absorbancia obtenido de las muestras se interpola en la curva de calibración o se efectúa el cálculo mediante la ecuación de la recta obteniéndose el resultado en mg/dl.

Expresión del resultado: en mg/dl.

1.7 Sección de control de calidad

a. Control de repetitividad: en el caso del análisis de una serie de muestras, se deben realizar por duplicado. La diferencia entre los duplicados no debe ser mayor de 10%.
b. Se debe registrar los valores de los puntos de la curva, la pendiente y la ordenada al origen, en cada determinación.
c. Se debe realizar el análisis estadístico cada vez que se realice la determinación.

Bibliografía

a. Widdop B. (1986) Part 1: Analytical Techniques. Hospital Toxicology and Durg Abuse Screening en Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Second Edition. Editorial The Pharmaceutical Press, London, pág.4, 5 y 26.
b. Basic Analytical Toxicology (1995). Monographs - analytical and toxicologycal data. World Health Organization - Geneva, pág. 212 a 217.
c. International Program on Chemical Safety (IPCS) home page. Search aspirin: www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim642.htm fecha de consulta 19 de septiembre de 2005.
d. College of American Pathologists (1985). Clinical Laboratory Handbook for Patient preparation & Specimen Handling. Fascicle IV. Therapeutic Drug Monitoring/ Toxicology. Carbon Monoxide, blood.

Anexo I

COLINESTERASA

Método cinético a 405 nm para la determinación de colinesterasa en suero o plasma

Significación clínica

Se ha demostrado la existencia de dos colinesterasas: una es la acetilcolinesterasa o colinesterasa verdadera (acetil colina hidrolasa) que se encuentra en eritrocitos y terminaciones de nervios colinérgicos, y la otra es la butiril-colinesterasa o Pseudocolinesterasa que se encuentra en plasma, hígado, músculo liso y adipocitos.

La colinesterasa del suero o plasma (Che) o Pseudocolinesterasa está asociada a las siguientes condiciones clínicas:

1) Constituye un índice de función hepática, especialmente en hepatopatías crónicas. Se observa una buena correlación entre el aumento de GOT (AST) y la disminución de Che, en hepatitis infecciosas.

2) Su disminución indica intoxicación por insecticidas organofosforados, inhibidores de la Che.

3) En algunos individuos sensibles a la succinilcolina, relajante muscular administrado durante la anestesia, se observa una apnea post-anestésica prolongada y en algunos casos, fatal. Esto coincide con la presencia de una variante genética de la Che ("atípica") incapaz de hidrolizar a la succinilcolina. En sujetos normales, esta droga es hidrolizada "in vivo" por la Che, en 1 a 4 minutos, por eso la apnea también se relaciona con bajos niveles de Che total.

Fundamento del Método

butirilcolina + HO_2 $\xrightarrow{\text{Che}}$ tiocolina +butirato

tiocolina +DTNB $\longrightarrow$ 2-nitro-5 mercaptobenzoato

Reactivos no provistos

Solución fisiológica

Instrucciones para su uso

Reactivo B: listo para usar. Puede presentar cristales que sedimentan en reposo y no afectan su reactividad. Pipetear sin remover el sedimento.

Reactivo A: agregar 3 ml de Reactivo B a un vial de Reactivo AS. Tapar y agitar hasta disolución completa. Reconstituir en el momento de usar.

Precauciones

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

El cambio de coloración de los reactivos puede indicar deterioro de los mismos.

Muestra

Suero o plasma

a. **Recolección**: se debe obtener suero de la manera usual
b. **Aditivos**: en caso de emplear plasma como muestra, se recomienda el uso de heparina o EDTA (Anticoagulante W de Wiener lab.) como anticoagulantes para su obtención.

Material requerido

-Espectrofotómetro
-Micropipetas y pipetas
-Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas
-Baño de agua
-Cronómetro

Condiciones de reacción

-Longitud de onda: 405nm

-Temperatura de reacción: 25, 30 o 37°C

-Tiempo de reacción: depende del PROCEDIMIENTO (I o II)

-Volumen de muestra: 20ul

-Volumen de Reactivo A: 3ml

-Volumen final de reacción: 3,02 ml

I- Procedimiento con ΔT fijo **A) 25-30°C** En una cubeta mantenida a la temperatura elegida, colocar:	
Reactivo A reconstituido	3 ml
Preincubar unos minutos. Luego agregar:	
Muestra	20 ul
Mezclar inmediatamente y leer la absorbancia, disparando simultáneamente el cronómetro. Volver a leer luego de 30, 60 y 90 segundos exactos. Determinar la diferencia promedio de absorbancia cada 30 segundos (ΔA/30 seg) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos. **B) 37°C** Usar Muestra diluida ½ con solución fisiológica y seguir el procedimiento descripto (I-A). Multiplicar el resultado obtenido por 2.	

I- Cálculo de resultados

Colinesterasa (U/I) = ΔA/30 seg x 22.710.

Equivalencia de unidades:

1U/ml = 1kU/l = 1000U/l

II- Procedimiento con ΔA fijo

A) 25 - 30°C

En una cubeta mantenida a la temperatura elegida, colocar.

Reactivo A reconstituido	3 ml

Preincubar unos minutos. Luego agregar:

Muestra	20 ul

Mezclar inmediatamente; registrar la absorbancia, disparando simultáneamente el cronómetro y medir el tiempo en segundos en que se produce un aumento de absorbancia de 0,100 (ΔA = 0,100 D.O.). Medir tres intervalos de tiempo consecutivos. Determinar el valor medio de los tiempos obtenidos (ΔT/0,100 D.O.) y utilizar este promedio para los cálculos.

B) 37°C

Usar Muestra diluida al ½ con solución fisiológica y seguir el procedimiento descripto (II-A). Multiplicar el resultado obtenido por 2.

II- Cálculo de los resultados

$$\text{Colinesterasa (U/l)} = \frac{68.120}{\Delta T/0{,}100 \text{ D.O.}}$$

Dónde:

ΔT: tiempo promedio en segundos

Valores de referencia

25°C	30°C*	37°C*
3.200-9.00 U/l	3.962-11.142 U/l	4970-13.977

*Calculados

Conversión de unidades al sistema SI

Colinesterasa (kU/l) = Colinesterasa (U/l) x 0,001

Limitaciones del procedimiento

Para preservar la integridad de los reactivos deben evitarse todo tipo de contaminaciones, empleando para la medición únicamente Micropipetas perfectamente limpias y secas.

Performance

a) Reproducibilidad: empleando el procedimiento I (con ΔT fijo) y procesando replicados de las mismas muestras en un mismo día, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
6.145 U/l	±90.8 U/l	1.47%
2.584 U/l	±67.0 U/l	2.59%

b) Límite de detección: el mínimo cambio de actividad detectable es 23 U/l.

c) Rango dinámico: si ΔA/30 seg es superior a 0,250 (procedimiento con ΔT fijo) o ΔT/0,100 D.O. es inferior a 5 segundos (procedimiento con ΔA fijo), se debe repetir la determinación con Muestra diluida ½ o 1/5 con solución fisiológica, corrigiendo consecuentemente los resultados.

d) Rango dinámico: la reacción es lineal hasta 5.650 U/l cuando se emplea el procedimiento con ΔT fijo y hasta 9.000 U/l cuando se emplea el procedimiento con ΔA fijo.

Anexo J

LC / MS ANÁLISIS DE 35 DROGAS EN SANGRE ENTERA HUMANA POR EXTRACCIÓN DE FASE SÓLIDA

Oasis® HLB método de extracción

Oasis® HLB 1 cc/30 mg cartucho de extracción

(WAT094225) or 3 cc/60 mg (WAT094226)

Condición
1mL methanol / 1mL agua
Carga
1 mL sangre entera humana
Lavado
1 mL 5% metanol en agua
Elusión
1 mL metanol
Evaporización y reconstitución
Llenar con 1 mL de metanol. Filtrar con 0.45 µm filtro de membrana

Método LC/MS

Sistema: Alliance™ -Platform LCZ system

Columna: L-column ODS

Temperatura: 40°C

Inyeccion: 5µL

Fase móvil: A: metanol

B: 10mM acetato de amonio

Gradiente: A:B=60:40 – 90:10/40min

Velocidad de flujo: 0.15 mL/min

Ionización: ESI

Modo de exploración: SIR

Voltaje del cono: 30v

Voltaje del capilar: 3.1k

Componente	Concentración µg/mL	% Recuperación (n=3)	Ion minoritario
Acetaminofeno	0,04	104 ± 2,8	150,1 (-)
Alprazolam	0,19	101 ± 2,5	309,3
Bromazepam	0,20	90,2 ± 8,8	316,1
Bromvalerylurea	2,00	94,5 ± 10,2	223,1
Carbamazepina	0,52	102 ± 3,4	237,2
Clordiazepoide	0,20	70,8 ± 10,7	300,3
Clorpromazina	0,30	105 ± 2,8	319,3
Clotiazepam	0,27	101 ± 3,4	319,1
Cocaína	0,25	102 ± 4,3	304,3
Diazepam	0,30	100 ± 4,2	285,2
Etenzamida	0,27	103 ± 3,1	166,1
Etizolam	0,24	100 ± 1,5	343,3
Estazolam	0,10	98,5 ± 3,4	295,5
Flunitrazepam	0,21	104 ± 3,2	314,3
Flutazolam	0,25	104 ± 2,8	377,3
Haloperidol	0,10	101 ± 2,9	376,4
Haloxazolam	0,25	32,0 ± 12,4	378,2
Imipramina	0,37	84,3 ± 6,9	281,4
Lidocaína	0,20	100 ± 5,4	253,3
Levomepromazina	0,25	84,8 ± 10,0	329,2
Metanfetamina	0,26	70,0 ± 13,7	150,2
Morfina	0,30	93,2 ± 3,6	286,4
Nitrazepan	0,23	104 ± 3,8	282,2
Oxazolan	0,45	70,1 ± 10,2	329,5
Perfenazina	0,20	45,2 ± 8,9	404,4
Fenobarbital	0,42	100 ± 2,7	231,1 (-)
Prometazina	0,10	70,0 ± 9,8	285,2
Propericiazine	0,20	57,8 ± 5,8	366,4
Sultopride	0,45	98,2 ± 3,4	355,4
Triazolam	0,13	92,8 ± 5,6	343,1
4-OH-Triazolam	0,10	72,0 ± 6,8	359,1
α-OH-Triazolam	0,10	68,8 ± 10,6	359,1
Trihexyphenidyl	0,13	89,9 ± 9,4	302,5
Zotepine	0,38	71,2 ± 6,1	332,4

Anexo K

ALCALOIDES

1. Reacción de Marquis

El reactivo se prepara disolviendo 5 gotas de formol 40% en 5ml de ácido sulfúrico concentrado,

En piedra de toque se coloca 1 gota del extracto y 5 gotas de reactivo, Se observan las siguientes coloraciones:

***Morfina**:* rojo durazno ⟶ violeta ⟶ azul violeta

(esta reacción es común a todos los alcaloides fenantrénicos del opio)

***Atropina**: pardo* ⟶ verde

***Estricnina:** incoloro*

Codeína: violeta rojizo ⟶ violeta azulado

***Heroína*:** rojo ⟶ violeta

***Cafeína*:** blanco

2. Reacción de Marchand – Otto

Sobre una gota del residuo se agregan 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado y luego unos cristalitos de dicromato de potasio, Esta es una reacción característica para **estricnina** dando una serie de coloraciones que van desde el violeta, violeta azulado, violeta rojizo, rojo al anaranjado,

Esta reacción es positiva para la estricnina siempre que el residuo obtenido sea puro, ya que las impurezas interfieren notablemente la reacción, obteniéndose en ese caso un *color verde* intenso por la reducción del ión dicromato por la materia orgánica,

En este caso, y cuando se sospecha que se trata de estricnina, se puede hacer un ensayo muy seguro y sensible que es el de Malaquin – Deginés, Cosniste en colocar un tubo de ensayo 1 – 2ml de solución de alcaloide con igual volumen de una solución clorhídrica de cloruro mercúrico al 10% y 2 a 3g, de Zn en granallas, Hervir en baño maría 5 a 10 minutos, enfriar y luego colocar unas gotas sobre una placa de toque en dos de las cavidades, A una de ellas se le agregan 1 – 2 gotas de solución reciente de nitrito de sodio al 0,5%, y a la otra 1 – 2 gotas de agua de bromo a saturación, En caso positivo aparecerá en la primera cavidad un color rojo de intensidad variable y en la segunda, un color rojo púrpura (reacciones de la tetrahidroestricnina),

3. Reacción con ácido sulfúrico concentrado

En una placa de toque se coloca 1 gota del extracto, más 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, Se observarán las siguientes coloraciones:

Morfina: incoloro ⟶ rojo

Cocaína**:** incoloro

Codeína**:** incoloro ⟶ azul

Quinina**:** amarillo claro

Estricnina: ½ KOH ⟶ pardo anaranjado

Nicotina**:** incoloro

Apomorfina**:** incoloro

4. Reacción con ácido nítrico concentrado

1 gota del extracto, más 5 gotas de ácido nítrico concentrado, Se observarán las siguientes coloraciones:

Nicotina**:** incoloro

Cocaína**:** incoloro

Atropina**:** incoloro

Morfina**:** naranja ⟶ amarillo

Codeína: amarillo⟶ rojizo

Apomorfina: rojo

A. REACCIONES GENERALES DE ALCALOIDES

Reactivos:

Bouchardat:

Existen varias fórmulas que difieren en las proporciones, La preparamos disolviendo 1g, de Kl en la menor cantidad posible de agua destilada y agregando luego 0,5g, de I_2, Una vez disuelto el yodo llevar a 100ml con agua destilada,

Con las sales de alcaloides da un ppdo castaño – pardo fácilmente distinguible sobre fondo blanco,

Valser Mayer:

Saturar una solución de Kl al 10% con un exceso de HgI_2, Algunos autores atribuyen al complejo formado la fórmula (HgI3), Con los alcaloides da ppdos de color blanco amarillentos,

Dragendorff:

Disolver 8g, de subnitrato de bismuto en 20ml de NO3H de densidad 1,18 (se prepara mezclando 20ml de nítrico concentrado con 50 de agua destilada),

Volcar esta solución sobre otra que contiene 22,7g, de KI en la menor cantidad posible de agua (20-25 ml), Dejar en reposo para decantar el NO3K, separar y diluir a 100ml,

Origina ppdos de color naranja – rojo con los alcaloides,

Solución saturada de Ácido Pícrico:

Disolver 1,2g, de ácido pícrico en 100ml de A, D, Conservar en frasco color caramelo, Con los alcaloides da ppdos de color amarillo,

Técnica:

Colocar 4 gotas del extracto obtenido en las correspondientes cavidades de una placa de toque, Agregar a una de ellas 1 gota del reactivo de Valser Mayer, a otra 1 gota del reactivo de Bouchardat, a otra 1 gota del reactivo de Dragendorff y a la última 1 gota de solución saturada de ácido pícrico, Se obtendrán ppdos con los colores indicados anteriormente, La reacción con ácido pícrico es poco sensible, por lo que a veces no da ppdo mientras que sí lo hacen los otros tres,

Se debe destacar que en caso de tratarse de vísceras en estado de putrefacción puede haber formación de compuestos básicos (tomaínas o que dan también positivas estas reacciones),

ANEXO VII

MANUAL DE PROCEDIMIENTO TÉCNICO
GENÉTICA

Las muestras que ingresan al Gabinete de Genética Forense pueden ser Biológicas **y** no Biológicas**.**

El material a peritar es transportado del sector de Mesa de Entrada al sector Genética o bien reservado en las heladeras o freezers dispuestos para su conservación (de acuerdo a la naturaleza de los materiales a analizar). El material permanece en la Sección hasta que la pericia se finalice.

Muestreo

En primera instancia se describe el material de acuerdo a su naturaleza y se toman muestras representativas para análisis de pruebas presuntivas (sangre, semen).

Paralelamente, se van completando los datos correspondientes en los libros internos de la Sección. Estos registros escritos servirán posteriormente para la confección del informe Pericial. La ventaja que poseen estos cuadernos periciales es, principalmente, la posibilidad de tomar notas que sean importantes para el desarrollo analítico de las muestras que no se pueden consignar en un informe por ser subjetivas o de presunción sin certezas y de eventualmente, reconstruir todo lo actuado en la pericia.

En ellos se consignan los datos tales como legajo y/o causa, dependencia interventora, Fiscal, nombre del/los imputado/s y damnificado/s, y descripción del material recibido.

Durante este procedimiento se describe:

a) Tipo y condiciones en las que fue remitido el contenedor.

b) Envoltorios y material que se halló en el interior del/los mismo/s y todos aquellos datos que resulten de interés pericial. Acto seguido, se procede a guardar el material remanente de la pericia en su/s envoltorio/s original/es y se introducen en la/s bolsa/s o el/los sobre/s original/es.

A continuación se describirá la secuencia de trabajo que se aplica a las muestras seleccionadas en el área de Genética para estudios de polimorfismos del ADN.

El siguiente esquema sobre la preparación y el análisis genético de muestras biológicas proporciona una orientación para el pre-tratamiento y extracción del ADN de la muestra a analizar. Se describirán procedimientos de extracción de ADN que se adecúan al tipo particular de material de partida. Debido a la diversidad de éstos, no hay una sistemática estándar, por lo tanto los diferentes procedimientos serán complementarios y orientativos. Estos protocolos de trabajo se pueden ejecutar en paralelo o en secuencia, y de acuerdo al caso y a las muestras remitidas, se decidirá la forma en que se debe aplicar la siguiente sistemática.

1. DIGESTIÓN DE LA MUESTRA, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

1.I. Extracción de ADN de sangre depositadas sobre Papel de Filtro/Hisopo.

Extracción automatizada mediante kits para Maxwell (Promega)

1. Rotular 1 tubo eppendorf de 2ml.
2. Cortar papeles de filtro de 1-2 mm de diámetro. La cantidad de papeles depende del soporte empleado, por ejemplo:
   Tarjeta Blood Stain Card: 2 papeles;
   Papel de Filtro 3MM de Whatman: 2 papeles;
   Hisopo con sangre o saliva
3. Colocar los papeles en un tubo eppendorf de 2 ml.
4. Agregar 500 µl TEC-SDS 0.5% + 10 µl Proteinasa K (concentración 20 mg/ml).
5. Incubar a 56°C over night, con agitación en vortemp a 750 rpm.
6. Descartar los papeles de filtro, cuidando de recuperar el máximo de líquido posible.
   (En el caso de que sean hisopos Para descartar la cabeza del hisopo perdiendo la menor cantidad de volumen, utilizar “DNA IQ Spin Baskets” (Promega): se coloca la cabeza del hisopo en el basket, luego se encaja el mismo (conteniendo la

cabeza del hisopo) en el tubo eppendorf de 2 ml, y finalmente se centrifuga a máxima velocidad por 30 seg) esto es previo al agregado del buffer de lisis.

7. Agregar 250 µl "Lysis Buffer" Promega preparado como: al buffer de Lysis original de Promega agregarle 320 µl de DTT 1 M.
   Este Buffer preparado aguanta a Temperatura ambiente 1 mes.
8. Mezclar con vortex a máxima velocidad.
9. Dejar a Temperatura Ambiente hasta el momento de usarlo.
10. Rotular los tubos de elusión provisto por el kit Maxwell (Promega).
11. Colocar los cartuchos en el soporte de Maxwell y retirar la protección.
12. Agregar la muestra en el extremo más alejado del cartucho y el tubo de elusión en la región proximal.
13. Agregar al tubo de elusión 30 µl "Elution Buffer" provisto por el kit Maxwell (Promega) y colocarlo en la región proximal del catridge. **Dejar el tubo de elusión abierto.**
14. Colocar el plunger.
15. Programar el equipo Maxwell.
16. Cargar el soporte conteniendo el cartridge con la muestra, el plunger y el tubo de elusión.
17. Al finalizar el programa, retirar el catridge y cerrar los tubos de elusión.

1.II. Extracción de ADN de sangre/saliva en soporte sólido (papel de filtro o tarjetas FTA Classic card Whatman).

Extracción con agua destilada

Protocolo para manchas de sangre/saliva depositados sobre papel FTA (posee isotiocianato de guanidina que inactiva virus por ser un precipitante de proteínas, actuando también como antibacteriano)

Preparación de las Muestras

1. Rotular y encintar tubos eppendorf de 2 ml (número en la tapa, nombre y número en el tubo)
2. Trabajar sobre servilleta de papel nuevo.
3. Cortar 5 papeles de 2 mm de diámetro con sacabocados con limpieza de alcohol entre muestras.
4. Colocar los papelitos en el tubo eppendorf ayudado por el punch.

Lavados

5. Lavar con 750 µl de FTA Purification Reagent Whatman (sólo desde paso 8 para papel absorbente) por 30 min a 37°C. Con agitación constante en el Vortemp, velocidad 700 rpm (*).
6. Descartar el sobrenadante con pipeta pasteur (*).
7. Repetir pasos Nº 5 y 6 (*).

(*) *sólo para papel FTA.*

8. Lavar con 750 µl de agua destilada por 10 minutos a 37ºC. Con agitación constante en el Vortemp, velocidad 700 rpm.
9. Descartar el sobrenadante con pipeta pasteur.
10. Repetir pasos Nº 8 y 9.
11. Descartar la mayor cantidad de líquido posible y dejar secando dejando destapado el tubo a 37°C over night en estufa (se comprueba que ya están secos cuando al agitar los papeles se levantan solos).
12. Ya secos guardarlos en el freezer.

1.III. Extracción de ADN de hisopo con Saliva.

Extracción automatizada mediante kits de Maxwell (Promega)

1. Rotular 1 tubo eppendorf de 2 ml.
2. Cortar la cabeza del hisopo y colocarla en un tubo eppendorf de 2 ml.
3. Agregar 500 µl TEC-SDS 0.5% + 10 µl Proteinasa K (concentración 20 mg/ml).

4. Incubar a 56ºC toda la noche, con agitación en Vortemp a 750 rpm.
5. Para descartar la cabeza del hisopo perdiendo la menor cantidad de volumen, utilizar “DNA IQ Spin Baskets” (Promega): se coloca la cabeza del hisopo en el basket, luego se encaja el mismo (conteniendo la cabeza del hisopo) en el tubo eppendorf de 2ml, y finalmente se centrifuga a máxima velocidad por 30 segundos.
6. Se descarta el basket con la cabeza del hisopo seca y se sigue con el tubo eppendorf 2ml con la solución.
7. Agregar 250 µl "Lysis Buffer” Promega preparado como: al buffer de Lysis original de Promega agregarle 320 µl de DTT 1M.
   El Lysis Buffer preparado es estable a temperatura ambiente 1 mes.
8. Mezclar con vortex a máxima velocidad.
9. Dejar a Temperatura Ambiente hasta el momento de usarlo.
10. Rotular los tubos de elusión provisto por el kit Maxwell (Promega).
11. Colocar los cartuchos en el soporte de Maxwell y retirar la protección.
12. Agregar la muestra en el extremo más alejado del cartucho y el tubo de elusión en la región proximal.
13. Agregar al tubo de elusión 30 µl “Elution Buffer” provisto por el kit Maxwell (Promega) y colocarlo en la región proximal del catridge. Dejar el tubo de elusión abierto.
14. Colocar el plunger.
15. Programar el equipo Maxwell.
16. Cargar el soporte conteniendo el cartridge con la muestra, el plunger y el tubo de elusión.
17. Al finalizar el programa, retirar el catridge y cerrar los tubos de elusión.

1.IV. Extracción de ADN de manchas en hisopos, telas, algodones, fibras, ropa, etc.

Extracción orgánica y purificación mediante Microcom YM-100
o mediante precipitación alcohólica

Preparación y Digestión de la Muestras

1. Recortar la zona de la mancha con la menor cantidad de prenda posible.
   En el caso de hisopos cortar la cabeza del mismo.

2. Poner la muestra en un tubo de 2 ml tipo Eppendorf.
3. Agregar 650 µl TEC-SDS 2% + 20 µl Proteinasa K (concentración 20 mg/ml).
   Si hay indicios de esperma se agregan 50 µl DTT 1M.
4. Incubar a 56°C over night, con agitación en termomixer a 750 rpm.
5. Para descartar el material original (la cabeza del hisopo o la prenda) perdiendo la menor cantidad de volumen, utilizar "DNA IQ Spin Baskets" (Promega): se coloca el material original en el basket, luego se encaja el mismo en el tubo eppendorf de 2ml, y finalmente se centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos.
6. Se descarta el basket con la muestra original y se sigue con el tubo conteniendo la solución.

Extracción Orgánica

7. Agregar 1 volumen de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (650 µl).
8. Dejar con agitación por 10 minutos.
9. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior y pasarla a un Eppendorf.
10. Lavado con 1 volumen de Cloroformo/Isoamílico.
11. Dejar con agitación por 10 minutos.
12. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior.

Opción 1: Purificación del ADN con Microcom YM-100

13. Cargar todo el sobrenadante en una columna de Microcom.
14. Centrifugar a 500 g por 25 minutos. Descartar el contenido que pasó por la columna.
15. Agregar 500 µl de agua bidestilada de sachet.
16. Centrifugar a 500 g por 20 minutos.
17. Repetir los pasos 15) y 16) dos veces.
18. Luego de centrifugar el tercer lavado, descartar el agua del tercer lavado, que pasó por la columna.
19. Agregar 30-40 µl de agua bidestilada de sachet (dependiendo del excedente que quede en la columna), invertir la columna en el tubo y centrifugar a 500g por 10 minutos.

Opción 2: Precipitación Alcohólica

13. A la fase acuosa en el tubo agregar 1/10 de ClNa 3 M. Agitar muy bien.

14. Agregar 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de Etanol absoluto. Agitar muy bien.

- Sí se forma una nube de ADN tomarla con un tip azul y traspasarla a un tubo de 2 ml tipo eppendorf. Seguir con el paso de limpieza (inciso 15).
- Si no se observa la nube, seguir de la siguiente manera:
  - Dejar por lo menos un over night en el freezer (-20°C).
  - Luego, se realiza una centrifugación a 11.000 rpm por 15 minutos.

  Descartar el sobrenadante. Con el pellet, seguir con el paso de limpieza (inciso 15).

15. Lavar el pellet con 1 ml etanol 70% y agitar bien.

16. Centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos.

17. Descartar sobrenadante por volcado del tubo. Y resuspender el pellet en agua destilada estéril (proporcional al pellet obtenido).

1.V. Extracción de ADN de uña.

Extracción orgánica y purificación mediante Microcom YM-100

1. Se coloca la uña en un tubo de 2ml tipo eppendorf.
2. Agregar 650 µl TEC-SDS 2% + 20 µl de PK (concentración 20mg/ml) + 50 µl DTT 1M.
3. Incubar over night a 56°C con agitación 750 rpm en Vortemp.

   La uña debe degradarse, de lo contrario agregar 50 µl de DTT e incubar una 1-2 horas más.

Extracción orgánica

4. Extracción con un volumen de Fenol (750 µl).
5. Dejar con agitación por 10 minutos.
6. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior y pasarla a un Eppendorf.

7. Lavado con 1 volumen de Cloroformo/Isoamílico (750 µl).
8. Dejar con agitación por 10 minutos.
9. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior.
10. Concentración con Microcom YM-100.

Purificación con Microcom YM-100

11. Cargar todo el sobrenadante en una columna de Microcom YM-100.
12. Centrifugar a 500 g por 25 min. Descartar el contenido que pasó por la columna.
13. Agregar 500 µl de agua bidestilada de sachet.
14. Centrifugar a 500 g por 20 min.
15. Repetir los pasos 15) y 16) dos veces.
16. Luego de centrifugar el tercer lavado, descartar el agua del tercer lavado, que pasó por la columna.
17. Agregar 30-40 µl de agua bidestilada de sachet (dependiendo del excedente que quede en la columna), invertir la columna en el tubo y centrifugar a 500 g por 10 minutos.

1.VI. Extracción diferencial de ADN de hisopado vaginal / hisopado anales / ropa interior / ropa con semen / uñas.

Extracción orgánica o mediante kits de Maxwell

1. Se rotulan 2 tubos: HVA (Hisopado Vaginal A) y HVB (Hisopado Vaginal B).
2. Si es bombacha se rotulan 2 tubos: BoA y BoB.
3. Colocar la prenda en el tubo B.
4. Agregar 750 µl de TEC-SDS 2% + 20 µl de PK vortex, se deja 4 hs a 56º C.
5. Mucho vortex, con un tip sacar la prenda escurriendo lo máximo posible sobre la pared del tubo (o utilizando DNAspin basket)
6. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
7. Pasar el sobrenadante al tubo A (material extraído de las células epiteliales) y poner over night a 56º C en vortemp a 700 rpm. Guardar a Tº ambiente o heladera.
8. Al pellet del tubo B agregar 750 µl de TEC-SDS 2% + 20µl PK + 40 µl DTT PK (o eventualmente **500 µl de TEC-SDS 0.5% + 10 µl de PK si es x Maxwell**)

(extracción de células espermáticas) y poner over night a 56º C en vortemp a 700 rpm.

9. Al día siguiente seguir con ambos tubos simultáneamente.

Opción 1: Extracción Orgánica

10. Agregar al mismo tubo 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (500 µl).
11. Agitar hasta emulsionar.
12. Centrifugar 5 min. A 13000 rpm.
13. Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo.
14. Agregar 1 volumen de cloroformo/isoamilico (500 µl).
15. Vortex prolongado y centrifugar 10 min a 11000 rpm.
16. Pasar la fase acuosa por Microcon YM-100. Centrifugar a 2800 rpm (500 g) hasta que pase todo el líquido (20 min).
17. Lavar con 500 µl de agua estéril. Realizar 3 veces 16) y 17).
18. Centrifugar la columna sola para terminar de secar 10 minutos a 500 g.
19. Reconstituir con 30 µl de agua estéril. Esperar 5 a 10 min.
20. Dar vuelta la columna, en un tubo nuevo y centrifugar 5 min a 10000 rpm.

Opción 2: Extracción por Maxwell

21. Añadir 250 µl de buffer de lisis.
22. Poner los cartridge en la base del Maxwell, sacarle la protección.
23. Rotular los tubos de elusión y agregar 30 µl de buffer de elusión a los mismos. Ubicarlos en el extremo externo.
24. Colocar la muestra en el extremo interno del Cartridge. Poner los Plunger. Poner la base en el equipo, apretar Run/Stop para que la base entre, cerrar la puerta del equipo.

1.VII. Extracción de ADN de músculo, tendones y cartílagos.

Opción 1: Preparación y Digestión de Muestras en Sal.

1. Extraer del tubo el tejido muscular. Cortar el Músculo en pequeños fragmentos con bisturí: esto ayuda a la digestión posterior.
2. Colocarlos en un vaso de precipitados y lavar el tejido con agua destilada, varias veces hasta que se hidrate y el líquido de lavado quede transparente.
3. Escurrir el exceso de agua y colocarlo en una placa de Petri.
4. Traspasar 250-300 mg de fragmentos de músculo a un tubo falcon de 15 ml (tapa a rosca).
5. Agregarle 3 ml de TEC-SDS 2% + 50 µl PK (stock 20mg/ml).
6. Incubar over night a 56ºC con agitación 750 rpm en Vortemp.
7. Realizar extracción orgánica del ADN.

Opción 2: Preparación y Digestión de Muestras Frescas.

1. Poner en una placa de Petri y cortar con bisturí en pequeños fragmentos.
2. Traspasar 250-300 mg de fragmentos de músculo a un tubo falcon de 15 ml (tapa a rosca).
3. Agregarle 3 ml de TEC-SDS 2% + 50 µl PK (stock 20mg/ml).
4. Incubar over night a 56ºC con agitación 750 rpm en Vortemp.
5. Realizar extracción orgánica del ADN.

Extracción Orgánica del ADN

1. Realizar una extracción con un volumen de Fenol (3 ml).
2. Dejar con agitación por 10 minutos.
3. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior y pasarla a un nuevo tubo de 15 ml.
4. Lavado con 1 volumen de Cloroformo/Isoamílico.
5. Dejar con agitación por 10 minutos.
6. Centrifugación 11.000 rpm por 10 min. Tomar fase acuosa superior.

7. Sí el músculo estaba con buen aspecto (color rojo) y olor la purificación del ADN se realiza mediante Precipitación (ver al final). Sí el músculo estaba en mal estado o degradado, se purifica mediante Microcom YM-30 (ver huesos).

Purificación de ADN mediante Precipitación.

Opción 1: Precipitación con ClNa + Etanol

1. A la fase acuosa en el tubo de 15 ml agregarle 1/10 de Cl Na 3M. Agitar muy bien.
2. Agregar 2 volúmenes de Etanol 96%.
3. Agitar muy bien.
   3.1. Sí se forma una nube de ADN tomarla con un tip azul y traspasarla a un tubo de 2 ml tipo eppendorf. Seguir con el paso de limpieza (punto 4).
   3.2. Si no se observa la nube, seguir de la siguiente manera:
      3.2.1. Dejar por lo menos 1 hora en el freezer (-20ºC). Luego, se realiza una **Centrifugación Enriquecida**:
      3.2.2. Agregar 2 ml de la solución en un tubo de 2ml tipo eppendorf.
      3.2.3. Centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos.
      3.2.4. Descartar el sobrenadante.
      3.2.5. Al pellet, agregarle otros 2 ml de la solución.
      3.2.6. Repetir los pasos 3.2.3 hasta el 3.2.5., hasta que se haya consumido el volumen total del tubo de 15ml. Seguir con el paso de limpieza (punto 4).
4. Lavar el pellet con 1.5 ml etanol 70% y agitar bien.
5. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos y descartar sobrenadante por volcado del tubo.
6. Centrifugar nuevamente por 2 minutos a máxima velocidad y retirar completamente el sobrenadante remanente con pipeta P200.
7. Secar la muestra en estufa, aproximadamente 15 minutos (se clarifica el pellet y no huele más a alcohol).
8. Resuspender hasta disolución total el pellet. El volumen de agua dependerá del tamaño del pellet.

Opción 2: Precipitación con ClNa + Isopropanol

1. A la fase acuosa en el tubo de 15 ml agregarle 1/10 de ClNa 3 M. Agitar muy bien.
2. Agregar **1 volumen** de Isopropanol Puro.
3. Agitar muy bien.
   3.1. Sí se forma una nube de ADN tomarla con un tip azul y traspasarla a un tubo de 2 ml tipo eppendorf. Seguir con el paso de limpieza (punto 4).
   3.2. Si no se observa la nube, seguir de la siguiente manera:
      3.2.1. Dejar por lo menos 1 hora en el freezer (-20°C). Luego, se realiza una **Centrifugación Enriquecida**:
      3.2.2. Agregar 2 ml de la solución en un tubo de 2ml tipo eppendorf.
      3.2.3. Centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos.
      3.2.4. Descartar el sobrenadante.
      3.2.5. Al pellet, agregarle otros 2 ml de la solución.
      3.2.6. Repetir los pasos 3.2.3 hasta el 3.2.5., hasta que se haya consumido el volumen total del tubo de 15ml. Seguir con el paso de limpieza (punto 4).
4. Lavar el pellet con 1.5 ml etanol 70% y agitar bien.
5. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos y descartar sobrenadante por volcado del tubo.
6. Centrifugar nuevamente por 2 minutos a máxima velocidad y retirar completamente el sobrenadante remanente con pipeta P200.
7. Secar la muestra en estufa, aproximadamente 15 minutos (se clarifica el pellet y no huele más a alcohol).
8. Resuspender hasta disolución total el pellet. El volumen de agua dependerá del tamaño del pellet.

Opción 3: Precipitación con Acetato de Amonio + Etanol

Recupera menor cantidad de ADN, pero logra una purificación mayor. En general, se usa como método de repurificación posterior a una precipitación alcohólica (etanol o isopropanol) con ClNa.

1. A la fase acuosa agregarle 1/2 de acetato de amonio 7.5 M. Agitar muy bien.
2. Agregar 2 volúmenes (del subtotal) de Etanol absoluto.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA DIGESTIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE ADN.

1. Proteinasa K (PK) - stock 20 mg/ml

a. Tomar un frasco de Proteinasa K (PK) ubicado en el freezer. Abrirlo y agregar 5 ml de agua bidestilada estéril apirógena de sachet con pipeta con tip azul estéril con filtro.

c. Agitar en Rotor por 1 hora a temperatura ambiente para una correcta homogenización.

d. Rotular tubos de 0,5 ml con etiquetas rojas con el rótulo PK.

e. Fraccionar los 5 ml de PK: 250 µl en cada tubo de 0,5 ml con pipeta con tip azul estéril con filtro.

f. Almacenar los tubos en el Freezer.

2. Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1)

NOTA: Trabajar en todo momento bajo Campana

a. Poner en funcionamiento la Campana: encender la luz y el extractor.

b. Mezclar 24 volúmenes de Cloroformo con 1 volumen de Alcohol Isoamílico en una probeta bajo campana.

NOTA: Para Preparar 250 ml de la solución, mezclar 240 ml de Cloroformo + 10 ml de Alcohol Isoamílico.

c. Tapar la probeta con papel de aluminio y mezclar bien por inversión.

d. Agregar la mezcla en un frasco de vidrio acaramelado con tapa a rosca.

e. Saturar la solución con 1 volumen de agua bidestilada estéril apirógena de sachet.

f. Mezclar muy bien por inversión.

g. Conservar en heladera.

NOTA: La fase inferior es la clorofórmica

3. Dithiothreitol (DTT) - stock 1M

a. Frasco de DTT ubicado en el freezer. Contiene 5 g de DTT.

b. Agregar al frasco 32,5 ml de agua destilada estéril apirógena.

c. Agitar en Rotor por 1 hora a temperatura ambiente para una correcta homogenización.

d. Fraccionar el DTT en tubos tipo eppendorf de 2 ml rotulados con etiqueta color amarillo.

e. Almacenar el tubo en el Frezzer.

4. SDS 20% (Sodium Dodecyl Sulphate)

a. Concentración: 20 g de SDS por cada 100 ml de agua.

c. Pesar ~ 20 g y llevar a volumen de 100ml con agua destilada estéril apirógena.

d. Agitar bien hasta disolución completa.

e. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos.

5. TRIS/HCl 1 M pH 8

a. Concentración: 1 mol de Tris/HCl por litro de agua. Peso Molecular: 121,14 gramos/mol.

b. Frasco de TRIS Base (500 gramos) de la empresa Biodynamics.

c. Rotular un frasco de vidrio con TRIS/HCl 1M pH8

d. Pesar ~121,1 g y agregar 800ml de agua destilada estéril apirógena

e. Agitar bien hasta disolución completa

f. Ajustar a pH 8 agregando HCl concentrado con pipeta pasteur.

g. Medir pH empleando tiras de pH 0-14.

h. Completar con agua destilada estéril apirógena enrasando en probeta a 1 litro.

i. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos

6. ClNa 3M (cloruro de sodio)

a. Concentración: 3 moles de ClNa por litro de agua. Peso Molecular: 58,4898 gramos/mol

b. Frasco de ClNa (500 gramos) de la empresa Biodynamics.

c. Rotular un Frasco de Vidrio con ClNa 3M.

d. Pesar ~ 17.5 g y agregar 80ml de agua destilada estéril apirógena.
e. Agitar bien hasta disolución completa.
f. Completar con agua destilada estéril apirógena enrasando en probeta hasta 100ml.
g. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos.

7. TEC-SDS 0,5%

Composición: 10 mM TRIS, HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM ClNa y SDS 0,5%

Preparación:
a. Rotular un tubo falcon de 50 ml.
b. Agregar agua destilada estéril apirógena hasta 3/4 del tubo.
c. Agregar 1,25 ml de SDS 20 % con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
d. Agregar 0,5 ml TRIS/HCl 1M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
e. Agregar 1 ml EDTA 0,5 M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
f. Agregar 1.66 ml ClNa 3M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
g. Completar los 50 ml con agua destilada estéril apirógena.
h. Agitar en Rotor por 1 hora a temperatura ambiente para una correcta homogenización.
i. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos.

8. TEC-SDS 2%

Composición: 10 mM TRIS, HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM ClNa y SDS 2%

Preparación:
a. Rotular un tubo falcon de 50 ml.
b. Agregar de agua destilada estéril apirógena hasta 3/4 del tubo.
c. Agregar 5 ml de SDS 20 % con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
d. Agregar 0,5 ml TRIS/HCl 1 M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
e. Agregar 1 ml EDTA 0,5 M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.
f. Agregar 1.66 ml ClNa 3 M con pipeta automática con tip azul estéril con filtro.

g. Completar los 50 ml con agua destilada estéril apirógena.

h. Agitar en Rotor por 1 hora a temperatura ambiente para una correcta homogenización.

i. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos.

9. Etanol 70%

a. Rotular un tubo falcon 50 ml.

b. Agregar 35 ml de etanol puro.

c. Agregar 15 ml de agua destilada estéril apirógena en sachet.

d. Agitar en Rotor por 15 minutos a temperatura ambiente para una correcta homogenización.

e. Almacenar a temperatura ambiente en la Alacena de Reactivos.

PROTOCOLO PARA EMBALAJE DE MUESTRAS
LABORATORIO DE INVESTIGACION FORENSE
MINISTERIO PUBLICO FISCAL

Si las muestras o evidencias no se encuentran debidamente documentadas, colectadas, empaquetadas y preservadas, no reunirán los requerimientos legales ni científicos para ser admisibles en juicio.

La forma de identificación será de la siguiente manera:

- Número de legajo y número de evidencia
- Carátula
- Nombre de la víctima a la cual se le extrajo la muestra
- Tipo de muestra
- Fecha y hora
- Fiscal y/o Juez
- Responsable de la muestra

En el caso de las muestras para Anatomopatología, el rótulo debe estar escrito con lápiz de grafito negro. En las muestras para Toxicología y Genética deben rotularse con marcador indeleble.

Para transportar las muestras que requieren refrigeración, en todos los casos se utilizará hielo seco (dióxido de carbono en estado sólido). Si no es posible utilizar hielo seco, se procurará utilizar frío-pack (gel refrigerante en sachet) en cantidad necesaria alrededor del/los embalaje/s secundario/s.

Las muestras que se remitirán al laboratorio, deberán conservar la cadena de frío (-4°C).

En cuanto a la forma de embalaje, la misma debe ser:

a. *MUESTRAS PARA ANATOMOPATOLOGÍA*: la muestra deberá incluirse en formol al 10% en un recipiente lo suficientemente amplio para su correcta fijación. Se sugiere un volumen dos tercios superior al de la pieza. Dicho recipiente deberá estar cerrado, precintado y rotulado correctamente.

Cuando sea necesario enviar la muestra al laboratorio, el recipiente deberá colocarse en una conservadora de telgopor o en una caja de cartón, con el tamaño correspondiente según la muestra, y poner material absorbente (papel de diario o papel madera) entre los recipientes y la caja para evitar el movimiento del recipiente.

b. *MUESTRAS PARA TOXICOLOGÍA*: deberán estar refrigeradas según se describe en el protocolo de preservación de muestras toxicológicas (Anexo II).

Recipiente primario: es el que contiene el material a transportar. Puede ser de polipropileno o poliestireno cerrado herméticamente a fin de evitar pérdidas. Todos los componentes del contenedor que estén en contacto con la muestra, deberán estar libre de sustancias que pueden interferir con el test de laboratorio y sus resultados; deberán ser nuevos, con buen cierre y asegurados con cinta adhesiva.

Recipiente secundario: es el que contiene el o los recipientes primarios. Deberá ser de un material irrompible, con tapa con cierre hermético y de volumen adecuado que permita retirar el recipiente primario.

Por último, deberá haber material absorbente (papel, algodón o paño) en cantidad suficiente para contener y proteger las muestras en caso de derrame. Éste deberá colocarse entre los recipientes primarios y el embalaje secundario, junto con el

frío-pack (gel refrigerante en sachet). Si se colocan varios recipientes primarios en un mismo embalaje secundario, los primarios deberán envolverse a su vez individualmente.

En cuanto a los embalajes exteriores (conservadora de telgopor), deberán incluirse en cada uno las muestras de un solo individuo para evitar confusiones en caso de alteración de etiquetas.

c. *MUESTRAS PARA GENÉTICA:* las muestras que fueron refrigeradas o congeladas previo al traslado deberán estar refrigeradas o congeladas, según corresponda, teniendo la precaución de que no estén en contacto directo las muestras con el refrigerante; las muestras que no han sido refrigeradas ni congeladas antes del traslado, deberán enviarse a temperatura ambiente. En forma alternativa, el material cadavérico puede conservarse hasta el momento de su remisión al laboratorio en tubos o frascos conteniendo ClNa sólido (sal). El material preservado mediante este procedimiento no deberá ser congelado en ningún momento.

Las muestras que fueron recolectadas sobre papel de filtro, los hisopos tomados de la mucosa yugal, las manchas provenientes de prendas o el material ungueal y subungueal, deberán colocarse perfectamente secos, cada uno en un sobre de papel individual, nuevo, rotulado y cerrado. Todos los sobres deben colocarse en un sobre impermeable con cierre hermético para evitar que cualquier líquido que eventualmente se derrame durante el transporte pueda mojar las muestras.

Tanto las manchas frescas como las secas deberán ser recolectadas según el protocolo de toma de muestra del gabinete de genética (Anexo III), y luego colocadas individualmente en un sobre de papel rotulado.

En el caso de muestras sobre papel de filtro, los datos deben estar escritos sobre el mismo papel de filtro, utilizando un bolígrafo. Rotular además el sobre que contenga la tarjeta con los mismos datos.

En el rótulo debe constar el tipo de material biológico (sangre, tejidos blandos, huesos, manchas de semen, manchas de sangre, pelos, uñas, etc.) que contiene el envase y la identificación correspondiente a la muestra (por ejemplo: Muestra N° 1: muestra tomada de camisa azul perteneciente a la víctima).

Importante: nunca colocar directamente la muestra en bolsa de nylon, ni colocar muestras de diferentes orígenes en un mismo sobre.