



UNIVERSIDAD  
**SAN SEBASTIAN**  
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA  
SEDE SANTIAGO**

**Implementación de un método de análisis de los sitios polimórficos  
de los marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *Neisseria  
gonorrhoeae*, que contribuye a la investigación criminal de delitos de  
violación.**

Seminario para optar al título de Bioquímica

**Profesores guías:** Mg. José Andrés Carrasco Ramírez

Dr. Claudio Andrés Figueroa Gaete

**Estudiante:** Bárbara Elizabeth Cabello Silva

© Bárbara Elizabeth Cabello Silva.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

**Santiago, Chile**

**2023**

## HOJA DE CALIFICACIÓN

En Santiago, el 28 de Junio del año 2023 los abajo firmantes dejan constancia que el estudiante Barbara Cabello Silva de la carrera de Bioquímica ha aprobado su examen para optar al título de Bioquímico(a) con nota 7.0.



---

**Dra. Raquel Quatrini Nyqvist**



---

**Dra. Maria Jose Yañez Henriquez**



---

**Dra. Lilian Reyes Saez**

## DEDICATORIA

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres, quienes fueron un pilar fundamental en esta etapa de mi vida, ya que siempre me entregaron su apoyo incondicional.

A mi hermano, por siempre tratar de subirme el ánimo cuando se dificultaba la universidad.

A mi Dobby, por ser mi fiel compañero perruno en los tramos de estudio y escritura de informes.

Y a mis amigos, por siempre apoyarme a escapar de la rutina y el estrés de la vida universitaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por todo el cariño y apoyo que me han entregado siempre. A mis compañeros, por el apoyo que nos entregamos en estos cinco años de nuestra carrera. A mis tutores y profesores que tuve a lo largo de la carrera, por contribuir en mi formación profesional.

Y por último, a los funcionarios de la Unidad Genética Forense del Servicio Médico Legal, por su disposición y ayuda para la elaboración de mi seminario de título.



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN  
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA  
SEDE SANTIAGO**

**Implementación de un método de análisis de los sitios polimórficos  
de los marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *Neisseria  
gonorrhoeae*, que contribuye a la investigación criminal de delitos de  
violación.**

Seminario para optar al título de Bioquímica

**Profesores guías:** Mg. José Andrés Carrasco Ramírez

Dr. Claudio Andrés Figueroa Gaete

**Estudiante:** Bárbara Elizabeth Cabello Silva

Santiago, Chile

Junio, 2023

## SEMINARIO TÍTULO 2023

### LISTA DE CHEQUEO

INDICE		SI	NO	PÁGINA
<b>I</b>	Aspectos Generales	X		3
<b>I.1</b>	Investigador(a) Responsable	X		4
<b>I.2</b>	Institución Patrocinante	X		4
<b>I.3</b>	Financiamiento adicional comprometido por otras Instituciones interesadas en el Proyecto		X	4
<b>I.4</b>	Resumen de Recursos Solicitados		X	4
<b>I.5</b>	Objeto(s) de Estudio		X	4
<b>II.1</b>	Resumen	X		5
<b>II.2</b>	Abstract	X		6
<b>III</b>	Formulación del Proyecto, Marco Teórico y Discusión Bibliográfica	X		7
<b>IV</b>	Referencias Bibliográficas	X		22
<b>V</b>	Hipótesis de Trabajo	X		32
<b>VI</b>	Objetivos	X		32
<b>VII</b>	Metodología	X		33
<b>VIII</b>	Plan de Trabajo	X		38
<b>IX</b>	Trabajo Adelantado por el(la) Investigador(a) responsable		X	39
<b>X</b>	Recursos Disponibles		X	39
<b>XI</b>	Detalle y justificación de recursos solicitados	X		39
<b>XII</b>	Anexos:	X		43
	Certificado de Ética, Bioética, Bioseguridad, Permisos y Otros	X		43
	Certificado Instituto Antártico Chileno (INACH)		X	44
	Certificado de Publicaciones Aceptadas y/o En prensa		X	44
	Cotizaciones, Facturas Proforma y Otros documentos		X	44

## I. ASPECTOS GENERALES

Tipo Proyecto	Estudio Bibliográfico	Consejo	1	1. Ciencia 2. Tecnología	Duración (máximo años)	1
---------------	-----------------------	---------	---	-----------------------------	------------------------	---

**TÍTULO:** Implementación de un método de análisis de los sitios polimórficos de los marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *Neisseria gonorrhoeae*, que contribuye a la investigación criminal de delitos de violación.

Escriba 3 palabras claves que identifiquen la propuesta

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Violación	Marcadores genéticos <i>mtrR</i> , <i>gyrA</i> y <i>rpsJ</i>
------------------------------	-----------	--

Disciplina Principal (máx. 1) (*)	54	Disciplina Secundaria (máx. 2) (*)	12901
Disciplina OCDE (máx. 1) (*)	185		43
Sector de Aplicación (máx. 1) (*)	30	Región de Aplicación (ej. IV Región)	RM

(\*) Para completar la información requerida, utilice los códigos disponibles en la sección bases de datos y documentos, en <http://www.conicyt.cl/fondecyt/2013/03/15/concurso-iniciacion-en-investigacion-2013/>

### I.1. INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE

Cabello	Silva	Bárbara Elizabeth	20.325.855-0
<b>Apellido Paterno</b>	<b>Apellido Materno</b>	<b>Nombres</b>	<b>RUN o Pasaporte</b>
Av. Holanda 1265, departamento 903, Providencia, Santiago de Chile.			
<b>Dirección para envío de correspondencia (Calle, Nº, Depto., Comuna, Ciudad y País)</b>			
bcabello.s@gmail.com		(+56) 9 57642079	
<b>Dirección de correo electrónico</b>		<b>Teléfono</b>	

### I.2. INSTITUCIÓN PATROCINANTE

<b>Servicio Médico Legal, Unidad de Genética Forense</b>
<b>Universidad/Facultad/Departamento</b>

### I.3. FINANCIAMIENTO ADICIONAL COMPROMETIDO POR OTRAS INSTITUCIONES INTERESADAS EN EL PROYECTO.

NO APLICA

### I.4. RESUMEN DE RECURSOS SOLICITADOS (m\$)

NO APLICA

### I.5. OBJETO(S) DE ESTUDIO

NO APLICA, porque en este proyecto aún no se ha realizado un estudio con muestras reales.

## II. RESUMEN

Nombre Inv. responsable:	Bárbara Elizabeth Cabello Silva
Título Proyecto:	Implementación de un método de análisis de los sitios polimórficos de los marcadores genéticos <i>mtrR</i> , <i>gyrA</i> y <i>rpsJ</i> de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , que contribuye a la investigación criminal de delitos de violación.

En la actualidad, hay un incremento de aquellos delitos de connotación sexual, donde las pruebas de laboratorio a veces son insuficientes y no entregan toda la información que permita vincular al imputado con la evidencia y la víctima.

Por otra parte, existe un importante aumento de infecciones de transmisión sexual (ITS) causadas tanto por bacterias como virus. Por ello, sumando al aumento de casos de ITS, existe la posibilidad que los imputados portadores de ITS infecten a las víctimas, donde la detección microbiológica de estos agentes patógenos podría ser clave en la resolución de delitos sexuales. Sin embargo, los laboratorios forenses no cuentan con metodologías clínicas que permitan vincular al portador de una ITS con una víctima de violación.

La microbiología forense es una disciplina científica que tiene como objetivo resolver investigaciones criminalísticas, donde además permite determinar la presencia de microorganismos en las víctimas e imputados. De manera que, el implementar este laboratorio en el Servicio Médico Legal (SML), tendría como finalidad poder utilizarse como una herramienta adicional de identificación de algún patógeno que pudiera estar presente en este caso, donde permitiría diferenciar si existe una relación del patógeno que tiene la víctima con el patógeno no identificado que tenga el imputado. Para ello, se establecen métodos de detección en el laboratorio que permitan la distinción y diferenciación de microorganismos mediante marcadores moleculares, a través de las técnicas amplificación de ácidos nucleicos (de tipo PCR) y minisequenciación. Asimismo, la problemática de este estudio se centrará en el patógeno *Neisseria gonorrhoeae*, debido a su prevalencia, número de serotipos, distribución en las diferentes regiones de Chile y su vía de transmisión.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es encontrar a través de una revisión bibliográfica, la manera de implementar un laboratorio de microbiología forense en el SML en relación con los casos de violación y de *Neisseria gonorrhoeae* existentes en Chile, mediante un análisis microbiológico forense de los marcadores genéticos polimórficos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ*, que están presente en el patógeno de estudio.

**Palabras claves:** violación; *Neisseria gonorrhoeae*; y marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ*.

## II.2 ABSTRACT

Currently, there is an increase in sexually related crimes, where laboratory tests are sometimes insufficient and do not provide all the information that would allow linking the accused with the evidence and the victim.

On the other hand, there is a significant increase in sexually transmitted infections (STI) caused by both bacteria and viruses. Therefore, in addition to the increase in STI cases, there is the possibility that STI-carrying defendants may infect victims, where microbiological detection of these pathogens could be key in solving sexual crimes. However, forensic laboratories do not have the clinical methodologies to link an STI carrier to a rape victim.

Forensic microbiology is a scientific discipline that aims to solve criminal investigations, where it also allows determining the presence of microorganisms in victims and defendants. Therefore, the implementation of this laboratory in the Forensic Medical Service (SML, from Spanish "*Servicio Médico Legal*") would be used as an additional tool to identify any pathogen that could be present in this case, where it would allow to differentiate whether there is a relationship between the pathogen of the victim and the unidentified pathogen of the accused. For this, detection methods are established in the laboratory that allow the distinction and differentiation of microorganisms by means of molecular markers, through the amplification of nucleic acids (PCR type) and mini-sequencing techniques. Likewise, the problem of this study will focus on the pathogen *Neisseria gonorrhoeae*, due to its prevalence, number of serotypes, distribution in the different regions of Chile and its transmission route.

Therefore, the aim of this study is to find through a literature review, how to implement a forensic microbiology laboratory in the SML in relation to rape cases and *Neisseria gonorrhoeae* existing in Chile, through a forensic microbiological analysis of the polymorphic genetic markers *mtrR*, *gyrA* and *rpsJ*, which are present in the pathogen of study.

**Keywords:** rape; *Neisseria gonorrhoeae*; and genetic markers *mtrR*, *gyrA* and *rpsJ*.

### III. FORMULACIÓN DEL PROYECTO, MARCO TEÓRICO Y DISCUSIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los delitos sexuales en Chile son una prioridad de persecución criminal, debido al daño e impacto que provocan en las víctimas (Fiscalía de Chile, s.f.). Dentro de los aspectos legales en este tipo de delitos, es importante contar con una batería de pericias que permitan ayudar en el esclarecimiento de este tipo de crímenes. Actualmente, las pericias de laboratorio pueden ser insuficientes y no entregan toda la información necesaria para vincular al imputado con la evidencia y la víctima. En ese ámbito, se ha propuesto en los últimos años incorporar el área microbiología forense en Chile, ya que se ha visto en el país un aumento de las infecciones de transmisión sexual (ITS) sumado al aumento de los delitos de violación con la transmisión de estas enfermedades (Murch y Budowle, 2020; Cáceres-Burton, 2019).

De manera que, un laboratorio de microbiología forense proporciona metodologías que logran resolver investigaciones criminalísticas, donde cumple la función de poder utilizarse como una herramienta adicional de identificación cuando la determinación genética humana no lo permite, la cual posibilita la detección de algún patógeno que pudiera estar presente en un caso de delito de tipo violación, para poder distinguir si existe una relación del patógeno que tiene la víctima con el patógeno no identificado que tenga el imputado (National Research Council, s.f.).

Para ello, se deben establecer métodos de detección en el laboratorio que permitan la distinción de microorganismos, específicamente de las ITS, donde las tres que predominan en Chile son *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* (Cáceres-Burton, 2019; Goldstein, 2019). Sin embargo, este estudio se centrará en poder analizar marcadores moleculares de *Neisseria gonorrhoeae*, debido a su prevalencia (Instituto de Salud Pública (ISP), 2019), vía de transmisión (Ministerio de Salud (Minsal), s.f.), número de serotipos (Unemo et.al, 2016) y los casos que se han registrado en las distintas regiones de Chile (Minsal, 2019); a través de un análisis microbiológico forense de los marcadores que estén presentes en esta bacteria, para poder vincular esta ITS en una violación. De modo que, a futuro se pueda implementar un análisis de medición de diferentes ITS, para poder determinar un panel más completo

de estas infecciones en el imputado y establecer una relación con las víctimas de violación.

## **1. SERVICIO MÉDICO LEGAL**

El Servicio Médico Legal (SML) es una entidad pública, dependiente del Ministerio de Justicia, creada en el año 1915, con el objetivo de asesorar técnicamente a los Tribunales de Justicia del país y al Ministerio Público en materias medicolegales, a través de la remisión de informes periciales tanatológicos, de laboratorio, psiquiátricos y clínicos. La misión del SML es otorgar servicios altamente calificados en el ámbito de la medicina legal y las ciencias forenses (Servicio Médico Legal (SML), s.f.). Este servicio público, cuenta con diferentes departamentos y aéreas técnicas, en el cual, el área de laboratorio donde se encuentra la Unidad de Genética Forense, se realizan análisis de ADN nuclear, que se utiliza para pruebas de filiación biológica con respecto a paternidad y/o maternidad, en delitos sexuales, muerte súbita, entre otros (SML, s.f.; Minsal, s.f.).

### **1.1 La pericia forense**

La pericia forense es un campo que aporta información sobre la identificación e identidad de las personas en delitos, que desempeña un papel fundamental en los procedimientos judiciales y seguridad pública, ya que es una herramienta poderosa que ayuda a determinar culpables en delitos de tipo criminalística, sexuales, etc. y poder evitar una condena injusta en inocentes (Morrison et.al, 2018).

Los peritos forenses son aquellos científicos que usan técnicas analíticas y científicas, para examinar la evidencia de los delitos como rastros de sangre, cabello, fibra textil, etc., para poder preparar declaraciones legales que resuman los resultados de los casos judiciales. Por lo que, la resolución de los casos criminales pasa por la expertiz de los peritos, que, en virtud de su conocimiento o pericia, son capaces de dilucidar, mediante

el uso de herramientas tecnológicas, el vínculo entre víctima, agresor e imputado (Morgan, 2019).

La pericia forense utilizaba enfoques tradicionalmente químicos y biológicos para obtener resultados, pero son deficientes en el ámbito de la especificidad y sensibilidad. Por lo cual, en los últimos años, ha existido un desarrollo en la tecnología, específicamente en los sistemas de perfiles y análisis genético (denominado el método de la huella o perfil genético forense) de muestras humanas, a través del perfil “Short Tandem Repeats” (STR), que consisten en fragmentos cortos de la secuencia genética que se repite un número variable de veces, una a continuación de la otra (ejemplo: ATCGATCGATCG), siendo este número el elemento diferenciador entre alelos, que establece las probabilidades de match entre víctima, agresor o imputado, mayores a 99,9999% (Dror, 2018).

### **1.1.1 Muestras y evidencias biológicas**

Las muestras biológicas son una fuente inequívoca de la presencia de un individuo en el sitio de suceso, ya que portan información molecular de los individuos y específicamente su ADN (Singh, 2019).

La evidencia biológica es un tipo de evidencia física que, por su constitución molecular genética, provee información sobre la identidad de los sujetos implicados en un hecho criminal que es única y variable entre los individuos. Las fuentes de información biológica genética más relevantes son: sangre, semen, células epiteliales, fluidos vaginales, saliva, e inclusive la presencia de poblaciones de microorganismos, entre otras (Morrison et.al, 2018). Estas evidencias pueden hallarse en un soporte inerte, o ser recolectados en un examen médico-legal. De esta forma, estas muestras pasan a convertirse en elementos de prueba, en el cual, un profesional debe realizar un análisis pericial correspondiente (Singh, 2019).

Una adecuada recolección de las evidencias y su posterior análisis del perfil genético permite efectuar análisis comparativos entre un perfil de referencia o de la base de datos (de un individuo conocido) y el ADN obtenido del agresor, esto en colaboración de nuevas

plataformas genéticas con mayor sensibilidad y especificidad (Dror, 2018; Morrison et.al, 2018).

Sin embargo, existen delitos sexuales (como la violación) que quedan “indeterminados”, es decir, que no se hallan evidencias suficientes para establecer quién es el culpable de este delito, ya sea por falta de precisión en el día, hora y lugar del hecho; como también por el tiempo transcurrido de la toma de muestra desde que ocurrió el delito (después de las 72 hrs), con llevando a que la genética humana no es capaz de resolver este delito. De modo que, la falta de aplicación de los métodos clínicos en los laboratorios forenses para analizar microorganismos patógenos de tipo bacteriana o viral, dificultaría el juicio de la defensa en un tribunal al querer culpar al imputado, quedando este en libertad por falta de pruebas que lo inculpen (Revista de Ciencias Penales, 2018).

## **1.2 Delitos sexuales**

Los delitos sexuales son todos aquellos actos que atentan contra la libertad sexual de las personas, independientemente de su edad, estrato social, raza, etnia, género o nacionalidad. Entre los delitos sexuales de mayor ocurrencia se encuentran la violación y el abuso sexual, en donde solamente la violación se puede vincular en exámenes de laboratorio porque existen pruebas “físicas” que se puedan analizar como por ejemplo la determinación de perfil genético de imputado y víctimas, a diferencia de un abuso que es más difícil poder establecer o tener una evidencia que se permita analizar por este ámbito (Rodríguez, 2022).

La violación consiste en un delito sexual “carnal sin consentimiento” por vía vaginal, anal o bucal (Rodríguez, 2022), en una víctima por un agresor(a). Esta agresión contempla víctimas de distintas características, tanto sociales, demográficas y etarias (Murillo et al., 2021).

Según las estadísticas del Servicio Médico Legal, establecidas por los exámenes sexológicos en contexto criminal, en Chile, entre el año 2018 a 2021, existieron 17.381 casos de víctimas de delitos sexuales, de las cuales, 14.682 eran mujeres y 2.699 eran hombres (SML, 2022). A nivel mundial, se estima que alrededor de un 35% de las mujeres

y un 14,8% de los hombres en todo el mundo han sufrido algún tipo de delito sexual en algún momento de su vida (Borumandnia et.al, 2020; World Population Review, 2022).

Entre los años 2020 a 2021 en Chile, existieron 2.616 casos de violación, de las cuales, 2.331 eran mujeres y 285 eran hombres que se notificaron en el SML (SML, 2022).

Según datos notificados por la Policía de Investigaciones de Chile (PDI), no existe algún rango etario de víctimas de delitos sexuales, incluido violación, que no hayan sufrido este tipo de delito, donde el 85% de los casos, les ocurre a las mujeres prevalentemente (Policía de Investigaciones de Chile (PDI), 2021).

### **1.2.1 Evidencias biológicas en violación**

La evidencia biológica en violación es aquella en que se realiza una toma de muestra de hisopado del flujo genital, para detectar una infección de transmisión sexual en la víctima y en el posible imputado, además buscar presencia de semen y espermios, y si es posible, tomar fotografías o videos de la zona genital como evidencia del caso en la víctima, en el cual, esta muestra es un elemento fundamental de prueba en una investigación judicial. Además, se realiza una descripción anatómica de la zona genital. Esta evidencia, se puede encontrar en varios casos de agresión, siendo particularmente relevante en el caso de una violación, para poder identificar a él o los sospechosos (Dumache et.al, 2016).

Las muestras de semen es a veces la única forma de probar la ocurrencia de contacto sexual e identificar al perpetrador. Este fluido presenta una serie de componentes que pueden ser detectados en el laboratorio, entre ellos la fosfatasa ácida seminal que es una enzima que está presente en este tipo de muestra; el antígeno prostático específico, que es una serina proteasa originada de células epiteliales prostáticas que se encuentran en muchos tejidos como líquido seminal, orina masculina; en donde se aplica los estudios de ADN (STR) en las células epiteliales de estas (Dumache et.al, 2016).

En Chile, para preservar las muestras y obtener buenos resultados, los sistemas de justicia han diseñado guías procedimentales, que indican cómo realizar entrevistas, levantar evidencias que pueden ser aplicadas a una multitud de análisis bioquímicos de

acuerdo con la investigación que se lleve a cabo en Fiscalía, como por ejemplo la detección de una infección de transmisión sexual (generada por microorganismos) post agresión sexual a través de una muestra de flujo vaginal o salival, pero que no permite establecer el vínculo entre el violador con la víctima, solo permite identificar a la ITS (Minsal, 2016).

## **2. MICROBIOLOGÍA FORENSE**

La microbiología forense, o también llamada ciencia forense microbiana, nació hace más de 20 años en Estados Unidos como una disciplina científica dedicada a analizar microorganismos en evidencias de delitos sexuales, causas de muerte, bioterrorismo y guerra biológica. Esta disciplina aún se encuentra en etapa de desarrollo en varias naciones, ya que enfrenta desafíos científicos emergentes en la sociedad sumado al avance tecnológico a través del tiempo, que permite identificar distintas fuentes de agentes patógenos gracias al avance de la secuenciación genómica y otros métodos que permiten procesar datos complejos (Murch y Budowle, 2020; Elhaik et.al, 2021). En Chile, pese a existir un gran desarrollo en microbiología clínica y molecular, no existe este tipo de laboratorio microbiológico, específico de forense, debido a que requiere de herramientas tecnológicas como la secuenciación de ADN, que son costosas y que necesitan de peritos expertos en microorganismos (Kuiper, 2016).

Desde el punto de vista forense, algunos microorganismos, tanto por su abundancia y preservación en condiciones extremas como por sus factores de virulencia son importantes por su papel en el proceso de descomposición cadavérica o cuando existe una ausencia de evidencia de ADN humano en un delito. La detección de un delito sexual es una necesidad importante para el análisis forense que podría abordarse, por ejemplo, en estudios de patógeno público (Williams y Gibson, 2019). Por lo tanto, los microorganismos, como las infecciones de transmisión sexual, podrían proporcionar evidencia en diferentes escenarios forenses, incluidas las investigaciones de violación cuando no hay otro tipo de evidencia disponible.

### 3. INFECCIÓN DE TRANSMISIÓN SEXUAL

La infección de transmisión sexual (ITS) es aquella en que un patógeno transmite una infección, en hombres y mujeres, a través de relaciones sexuales vaginales, anales y/u orales sin protección; por contacto con secreciones o fluidos (descargas vaginales, uretrales o anales) que se transmiten de una persona a otra a través de estos fluidos. En el caso de las ITS que se manifiestan en forma de lesiones, verrugas o heridas, se transmiten por contacto directo con las lesiones, es decir, el germen pasa de una persona a otra a través del roce o contacto con estas lesiones. Algunas ITS también pueden transmitirse a través de la sangre o de la madre al niño/niña durante la gestación o el parto (Workowski, 2021; Goldstein, 2019).

Los más comunes que afectan a los humanos, son las producidas por los siguientes patógenos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, virus de papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humana, virus hepatitis B, entre otros (Kreisel et.al, 2021).

#### 3.1 ITS en una violación

Posterior a una violación, puede existir una transmisión de microorganismos entre agresor y víctima. Por lo que, la Norma General Técnica del Ministerio de Salud (Minsal) menciona, que además de la pericia biológica relativa a la búsqueda de ADN, también exige la obligatoriedad de la toma de muestra para evaluar presencia de algún(a) ITS, donde es más fácil su identificación cuando existe contacto sexual en la zona genital, para no involucrar otro tipo de microorganismo fuera del área en que ocurrió la violación, en la cual, la muestra será procesada por cultivo o algún método comparable aprobado por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo este último método el más utilizado (Minsal, 2016).

En literatura, se han reportado la transmisión de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* principalmente en las víctimas de violación, por ende su detección podría ser una herramienta relevante de comprobación para vincular al

sospechoso con la víctima, debido a que el aumento de infecciones, aumenta la probabilidad de que sujetos imputados sean transmisores de este microorganismo (Francés-Cuesta, 2019; Qin y Melvin, 2020; Sathirareuangchai et.al, 2014; Andreu et.al, 2021; Black et.al, 2009).

### **3.2 Epidemiología y prevalencia de las ITS**

Las ITS más prevalentes e incidentes a nivel mundial y que se considera de mayor preocupación por los aumentos de contagios en los últimos años es de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, virus inmunodeficiencia humana y virus del papiloma humano (Cristaudo y Giuliani, 2020).

En Chile, en los últimos 5 años, se ha visto un aumento de prevalencia e incidencia de las ITS, principalmente de infección por agentes bacteriano patógeno, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y *Chlamydia trachomatis* (Cáceres-Burton, 2019; Goldstein, 2019).

Según datos del Minsal, hasta el año 2019 se registró un aumento de casos preocupante de *Neisseria gonorrhoeae*, alcanzando el mayor peak entre el año 2017-2018, donde los hombres concentraron el 86,2% de prevalencia de esta ITS, el cual, en el grupo de 20 a 24 años, alcanzó un nivel más alto de incidencia de 15,7 casos nuevos notificados por cada cien mil habitantes (Minsal, 2019; ISP, 2019).

En el caso de *Chlamydia trachomatis*, hasta el año 2018, se registró un aumento de casos mayor en 52% de las mujeres versus un 48% en los hombres, en un grupo de jóvenes entre 15 a 24 años, considerando un máximo de incidencia de 13,7 casos nuevos notificados por cada cien mil habitantes (Hunneus-Vergara, 2018; Cannoni et.al, 2021; Hunneus, Schilling y Fernández, 2018).

En *Treponema pallidum*, hasta el año 2018, se observó un peak de prevalencia de un 65% del total de los casos en hombres, existiendo una incidencia de casos nuevos de 35,9 por cada 100.000 habitantes, donde el grupo que concentra el mayor riesgo y aumento de casos con esta infección es entre los 20 a 29 años (Minsal, 2019; Cáceres-Burton, 2019; Cáceres, 2018).

### **3.3 Elección de ITS en el estudio bibliográfico**

#### **3.3.1 Vía de transmisión de ITS**

Las ITS *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Treponema pallidum* se transmiten por:

\**Neisseria gonorrhoeae*: se transmite principalmente a través de las relaciones sexuales sin preservativo con una persona infectada con esta ITS (Minsal, s.f.).

\**Chlamydia trachomatis*: se transmite a través de las relaciones sexuales sin preservativo con una persona infectada con esta ITS (Minsal, s.f.).

\**Treponema pallidum*: se transmite a través de distintas vías, como vía sexual, mediante relaciones sexuales sin preservativo con una persona con esta ITS; vía transplacentaria o también llamada vía de transmisión vertical, que consiste en el traspaso de la ITS de la mujer embarazada al niño o niña durante la gestación; y vía sanguínea por compartir agujas y jeringas durante el consumo de drogas intravenosas como por ejemplo a través de transfusiones de sangre (Minsal, s.f.).

#### **3.3.2 Número de serotipos y subtipo de cepas**

El registro bibliográfico que existe del número de serotipos de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* que causan infección de transmisión sexual es 14 (Unemo et.al, 2016) y 11 (Tang et.al, 2015) respectivamente. En el caso de *T. pallidum*, no existe un dato de serotipos que se haya identificado, pero si existen datos de que tiene un subtipo de cepa llamada *T. pallidum* subesp. *pallidum* (Jaiswal et.al, 2020), que se transmite por contacto sexual .

#### **3.3.3 Distribución geográfica de casos de ITS en las regiones de Chile**

En el caso de *Chlamydia trachomatis* y *Treponema pallidum*, *C.trachomatis* se encuentra prevalentemente en la Región Metropolitana (Zamboni et.al, 2016; Huneeus, Schilling y Fernandez, 2018), pero *T.pallidum* se haya más repartida en las regiones, sin embargo

más de la mitad de los casos de 2018 se encontraban en la Región Metropolitana (Minsal, 2019). En cambio, *Neisseria gonorrhoeae* se encuentra en las distintas regiones de Chile, donde un poco menos de la mitad de estos casos se encuentra en la Región Metropolitana en el año 2018 (Minsal, 2019).

### 3.3.4 Selección ITS

Se selecciona *Neisseria gonorrhoeae* por sobre *C. trachomatis* y *T. pallidum* porque tiene mayor variabilidad de serotipos (Unemo et.al, 2016), lo que genera una mejor resolución en un caso de delito sexual, permitiendo discriminar y diferenciar a una mayor cantidad de personas en una comunidad en un delito de violación, que cuando son menos serotipos y subespecies, ya que es más probable que más personas padezcan los serotipos y subespecies de *Chlamydia trachomatis* y *Treponema pallidum* respectivamente.

También, esta elección se justifica, debido a que existe una mayor diversidad del nicho ecológico de *N. gonorrhoeae* en Chile, pues se encuentra en las distintas regiones del país (Minsal, 2019), pudiendo analizar casos de delitos de tipo de violación en las diferentes regiones con la ayuda de la toma de muestra de esta ITS. Además, sus vías de contagio se enfocan prevalentemente al contacto de la zona genital entre personas (Minsal, s.f.), favoreciendo que se pueda encontrar al culpable a través del análisis de esta *Neisseria*. A esto, se le suma que la elección de la ITS no debía tener una prevalencia en Chile muy alta como *Treponema pallidum*, ya que sería complejo el camino de encontrar a un culpable de este tipo de delito porque las personas de la comunidad tendrían una alta probabilidad de padecer esta ITS, sin ser el culpable necesariamente de una violación; ni tampoco una prevalencia muy baja como *Chlamydia trachomatis*, ya que no se justificaría gastar recursos en implementar un análisis microbiológico forense en esta ITS si tiene una baja prevalencia. Por ende, debía encontrarse en un punto intermedio de prevalencia, donde se encontraba en este caso *Neisseria gonorrhoeae*, donde alcanzó un peak de incidencia de 15,7 casos nuevos notificados por cada cien mil habitantes (ISP, 2019) al compararla con las otras dos ITS.

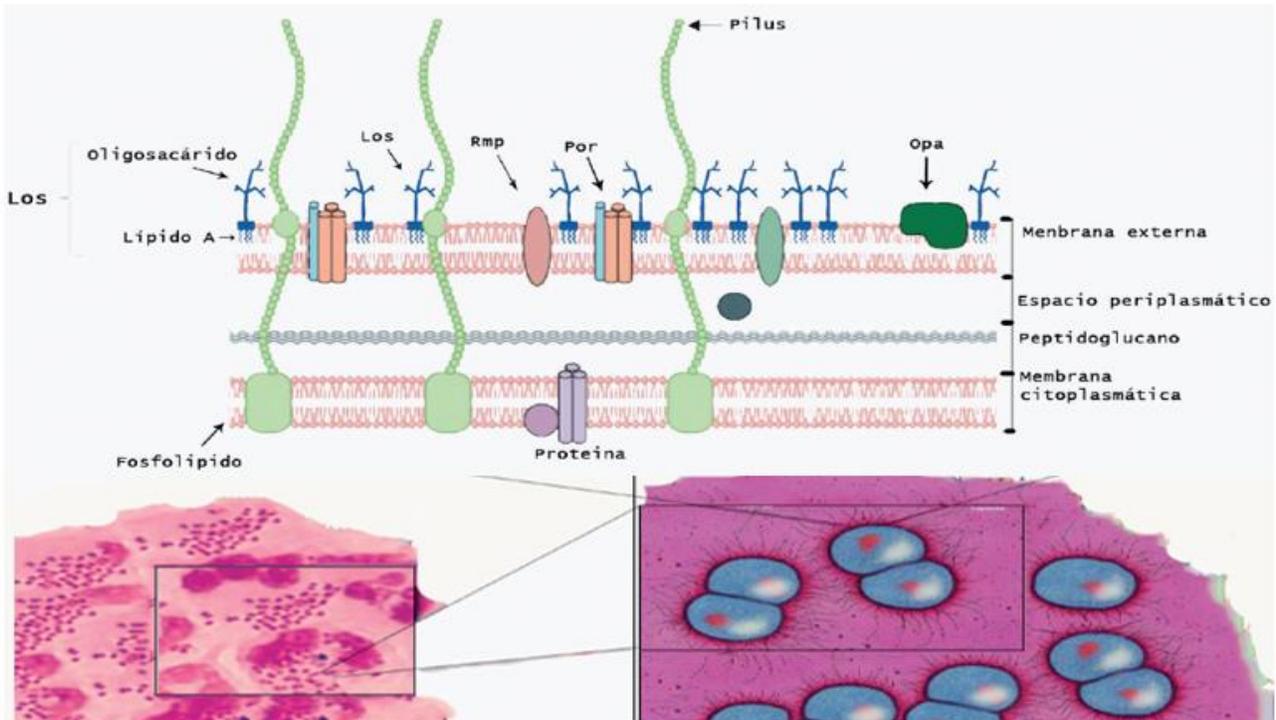
### **3.4 *Neisseria gonorrhoeae***

#### **3.4.1 Características**

*Neisseria gonorrhoeae* es una bacteria patogénica aeróbica, gramnegativa, de forma cocácea, dispuesta en pares (diplococos), son inmóviles, carecen de cápsula y no forman endosporas; además, los gonococos tienen un genoma circular que tiene una longitud de 2,14 Mbp (Cehovin y Lewis, 2017; Ortiz, Santander y Lugo, 2021).

Esta bacteria se transmite durante las relaciones sexuales o por contacto con fluidos biológicos infectados (por ejemplo, secreciones genitales o saliva), infectando principalmente la mucosa genital pero también puede colonizar la mucosa ocular, nasofaríngea y anal (Cehovin y Lewis, 2017).

Esta bacteria es altamente infecciosa debido a sus factores de virulencia (Figura 1) como pili tipo IV, proteínas porinas, proteínas Opa, las proteínas Rmp y los lipooligosacáridos (LOS). La pili de tipo IV tiene como función la adherencia a las células del huésped, la transferencia de material genético y la motilidad. Las proteínas de la porina tienen dos tipos, porA y porB, sin embargo, la porA es silenciosa en *N. gonorrhoeae*, pero porB (que es codificada por el gen *porB1b* específicamente) es la proteína de membrana externa más expresada y, gracias a la codificación de su gen, le permite cumplir la función de supervivencia a la bacteria, ya que puede interferir en la degranulación de los neutrófilos y facilitar la invasión de las células epiteliales. Las proteínas Opa (proteínas de opacidad) son una serie de proteínas de membrana que median la unión con células epiteliales y fagocíticas. Las proteínas Rmp cumplen el rol de estimular a los anticuerpos que bloquean la actividad bactericida de *Neisseria*. El lipooligosacárido, situado en la membrana externa, es relevante porque sirven para la adherencia y la invasión de las células del huésped (Singh, 2019).



**Figura 1: Estructura patogénica de *N. gonorrhoeae*, en formato macro y microscópica (Recuperado de Ortiz, Santander y Lugo, 2021).**

En varones, este tipo de infección afecta a la mucosa uretral, pero también pueden verse afectados los epitelios rectal, faríngeo y conjuntival. En las mujeres, esta infección afecta principalmente al epitelio cervical pero también puede colonizar el tejido vaginal. En los hombres, la infección urogenital es generalmente sintomática, con la aparición de uretritis en el 80% de los casos. En cambio, en las mujeres, cuando la infección afecta al cuello del útero, provoca síntomas vaginales como secreción, sensación de ardor y malestar. Si no se trata, puede dar lugar a una enfermedad inflamatoria pélvica, infecciones gonocócicas diseminadas y, aunque en menor probabilidad, endocarditis, meningitis e infertilidad (Cristaudo y Giuliani, 2020).

### 3.4.3 Marcadores moleculares en análisis clínico

En los laboratorios clínicos, la detección de diferentes ITS es muy frecuente, donde la tecnología de hoy en día ha permitido la multi-detección de microorganismos, a través de PCR múltiple. Los principales marcadores de detección en el ámbito clínico de *Neisseria*

*gonorrhoeae* son principalmente *porB1b*, *gyrA*, *mtrR* y *rpsJ* (Graham, Doyle y Jennison, 2017; Nicol et.al, 2014; Vidovic et.al, 2011; Iliina et.al, 2008).

#### **3.4.4 Selección de marcadores genéticos para el estudio**

Los marcadores genéticos basados en el ADN de la bacteria son usados en genética de poblaciones como marcadores de polimorfismo entre individuos y/o poblaciones (Castro y Sánchez, 2008), en el cual, se seleccionan los siguientes marcadores de *Neisseria gonorrhoeae* que son *mtrR*, *rpsJ* y *gyrA* para la metodología de minisequenciación, y *porB1b*, que este solo se utilizará para la metodología de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). Esto se debe a que, el gen *porB1b* es hipervariable, ya que puede estar sujeta a mutaciones y recombinaciones frecuentes, lo que puede llevar a que no se detecten las cepas predominantes de *N. gonorrhoeae* que circulan dentro de una comunidad durante un período prolongado de tiempo. De manera que, no serviría en el proceso de minisequenciación, pero si puede ayudar a la identificación de esta bacteria por el método de NAAT, de tipo PCR (Vidovic et.al, 2011). A diferencia de los otros 3 marcadores elegidos, que se identifican con éxito durante un largo período de tiempo y no son hipervariables, siendo relevante para realizar una minisequenciación (Graham, Doyle y Jennison, 2017). En cuanto a los sitios polimórficos de los cuatro marcadores polimórficos, permiten lograr diferenciar y caracterizar a las distintas cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, por lo que la identificación de estos sitios, cumplirían un importante rol para identificar al culpable en un delito de violación (Vidovic et.al, 2011).

##### **3.4.4.1 Marcador genético *porB1b***

El gen *porB1b* codifica a la proteína porB que le permite cumplir la función de supervivencia a la bacteria, ya que puede interferir en la degranulación de los neutrófilos y facilitar la invasión de las células epiteliales (Singh, 2019). Los sitios polimórficos de este marcador son setenta y dos, pero este valor puede variar, dependiendo de cada variante de la bacteria (Vidovic et.al, 2011).

#### **3.4.4.2 Marcador genético *mtrR***

El gen *mtrR* es un regulador transcripcional de la familia TetR, que regula la supervivencia gonocócica. La expresión de este gen se encuentra aumentada en la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, viéndose favorecida la capacidad de los gonococos a sobrevivir a la destrucción oxidativa por parte de los neutrófilos de la célula huésped (Folster et.al, 2009). Los sitios polimórficos de este marcador son entre tres a once, sin embargo, este número puede variar, dependiendo de cada variante de la bacteria (Graham, Doyle y Jennison, 2017; Olsen et.al, 2013; Liao et.al, 2011; Iliina et.al, 2008; NCBI, s.f.).

#### **3.4.4.3 Marcador genético *gyrA***

El gen *gyrA* actúa en el proceso de replicación de ADN bacteriano al codificar las dos subunidades de tipo A de la ADN girasa, que facultan que ocurra los giros negativos en el cromosoma de la bacteria, para que la girasa de ADN pueda catalizar el desenrollamiento de las moléculas de ADN y poder reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento del ADN (Marchese y Debbia, 2016; Kivata et.al, 2019). Los sitios polimórficos varían entre dos a ocho sitios, aunque el número exacto puede cambiar dependiendo del estudio y las cepas que se están analizando (Liu et.al, 2022; Iliina et.al, 2008; Unemo et.al, 2016; Demczuk et.al, 2017; Nicol et.al, 2014; Graham, Doyle y Jennison, 2017).

#### **3.4.4.4 Marcador genético *rpsJ***

El gen *rpsJ* interviene en el proceso de traducción de la bacteria, codificando a la proteína ribosomal 30S S10, que permite la unión de ARNt a ribosomas (Ortiz, Santander y Lugo, 2021; Hu et.al, 2005). En cuanto al número de sitios polimórficos, puede variar entre dos a cinco, dependiendo del aislado o cepa de *Neisseria gonorrhoeae* que se esté estudiando (Shaskolskiy et.al, 2018; Unemo et.al, 2016; Iliina et.al, 2008).

#### 4. RELEVANCIA DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

Debido a la prevalencia (ISP, 2019), número de serotipos (Unemo et.al, 2016), distribución en las regiones de Chile (Minsal, 2019), y su vía de transmisión (Minsal, s.f.) de *Neisseria gonorrhoeae*; su estudio, identificación y detección, podría tener un rol clave en aquellos casos de delitos sexuales donde la víctima o el imputado presentan esta infección. Este hallazgo podría otorgar elementos probatorios del contacto sexual cuando los métodos clásicos forenses, en una violación, no entregan la información suficiente.

Hasta la fecha, en el ámbito clínico, se conocen y están bien documentadas las técnicas de detección de *N. gonorrhoeae*, mediante el uso de biología molecular aplicada a los marcadores mencionados anteriormente. De este modo, este microorganismo permitiría una buena detección en otros ámbitos como el forense.

Por lo tanto, se utilizará los marcadores genéticos polimórficos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *N. gonorrhoeae*, ya que son los marcadores que pueden conducir a una detección de las variantes circulantes más predominantes en las diferentes regiones de Chile, y *porB1b* para solo identificar la presencia o no de *Neisseria*. Esto implicaría, la implementación de un laboratorio microbiológico orientado al ámbito forense en el SML. Esta implementación entregaría información adicional a la investigación criminal, ya que permite vincular a la víctima y el sospechoso a través de la detección de un mismo microorganismo, con los mismos marcadores moleculares, sobre todo en aquellos casos en que no hay detección de ADN humano del agresor en las evidencias y muestras tomadas a la víctima.

#### IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreu, L., Codina, M., Díaz-Faes, D., Esteban, E., Pereda, N., Quintillá, J., & Vallejo, V. (2021). Training and education in the Barnahus model: State of the art. Recuperado de: [https://www.ub.edu/steps\\_barnahusproject/documents/StateoftheArt-STEPS-ENG.pdf#page=38](https://www.ub.edu/steps_barnahusproject/documents/StateoftheArt-STEPS-ENG.pdf#page=38)
- Black, C., Driebe, E., Howard, L., Fajman, N., Sawyer, M., Girardet, R., Sautter, R., Greenwald, E., Beck-Sague, C., Unger, E., Igietseme, J., & Hammerschlag, M. (2009). Multicenter study of nucleic acid amplification tests for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae in children being evaluated for sexual abuse. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(7), 608–613. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31819b592e>
- Borumandnia, N., Khadembashi, N., Tabatabaei, M., & Alavi Majd, H. (2020). The prevalence rate of sexual violence worldwide: a trend analysis. *BMC Public Health*, 20(1835), 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09926-5>
- Cáceres-Burton, K. (2019). Informe: Situación epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual en Chile, 2017. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 221–233. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200221>
- Cáceres, K. (2018). Situación epidemiológica de sífilis. *Revista Chilena de Infectología*, 35(3), 284–296. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n3/0716-1018-rci-35-03-0284.pdf>
- Cannoni, G., Ribbeck, D., Hernández, O., & Casacuberta, M. J. (2021). Actualización de la infección por Chlamydia trachomatis en mujeres. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(2), 231–239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.09.003>
- Castro, M. & Sánchez, R. (2008). ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de *Perumytilus purpuratus*. *Revista Tumbaga*, 1(3), 128–140. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3994413>

- Cehovin, A. & Lewis, S. (2017). Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: movement for change. *Pathogens and Disease*, 75(6), 1–27. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx071>
- Cristaudo, A. & Giuliani, M. (2020). Sexually Transmitted Infections: Advances in Understanding and Management Sexually Transmitted Infections. Springer.
- Defensoría de la Niñez. (2021). OFICIO N° 606/2021. Recuperado de: <https://www.defensorianinez.cl/wp-content/uploads/2021/08/Oficio-N%C2%B0606-DIPUTADO-SR.-MARCOS-ILABACA-CERDA.pdf>
- Deguchi, T., Yasuda, M., Asano, M., Tada, K., Iwata, H., Komeda, H., Ezaki, T., Saito, I., & Kawada, Y. (1995). DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 561–563. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.561>
- Demczuk, W., Sidhu, S., Unemo, M., Whiley, D., Allen, V., Dillon, J., Cole, M., Seah, C., Trembizki, E., Trees, D., Kersh, E., Abrams, A., de Vries, H., van Dam, A., Medina, I., Bharat, A., Mulvey, M., van Domselaar, G., & Martin, I. (2017). *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance, a Novel Antimicrobial Resistance Multilocus Typing Scheme for Tracking Global Dissemination of *N. gonorrhoeae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1454–1468. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00100-17>
- Dror, I. (2018). Biases in forensic experts. *Science*, 360(6386), 243–243. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aat8443>
- Dumache, R., Ciocan, V., Muresan, C., & Enache, A. (2016). Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clinical Laboratory*, 62(245), 1–2. DOI: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150414>
- Elhaik, E., Ahsanuddin, S., Robinson, J., Foster, E., & Mason, C. (2021). The impact of cross-kingdom molecular forensics on genetic privacy. *Microbiome*, 9(114), 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01076-z>
- Fiorentino, F., Magli, M., Podini, D., Ferraretti, A., Nuccitelli, A., Vitale, N., Baldi, M., & Gianaroli, L. (2003). The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Molecular Human Reproduction*, 9(7), 399–410. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gag046>

Fiscalía de Chile. (s.f.). Áreas de Persecución Delitos Sexuales. Consultado el día 22 de septiembre de 2022. Recuperado de: <http://www.fiscaliadechile.cl/Fiscalia/areas/sexuales.jsp>

Folster, J., Johnson, P., Jackson, L., Dhulipali, V., Dyer, D., & Shafer, W. (2009). MtrR Modulates *rpoH* Expression and Levels of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 191(1), 287–297. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01165-08>

Francés-Cuesta, C., De la Caba, I., Idigoras, P., Fernández-Rodríguez, A., Del Valle, D., Marimón, J. & González-Candelas, F. (2019). Whole-genome sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* in a forensic transmission case. *Forensic Science International: Genetics*, 42(1), 141–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.07.003>

Goldstein, E. (2019). Las Infecciones de Transmisión Sexual en Chile, 1982-2018. Recuperado de: [https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27319/1/BCN\\_Infecciones\\_Trans\\_Sexual\\_Chile\\_Editado\\_final2\\_repos.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27319/1/BCN_Infecciones_Trans_Sexual_Chile_Editado_final2_repos.pdf)

Graham, R., Doyle, C., & Jennison, A. (2017). Epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* and detection of markers associated with antimicrobial resistance directly from urine samples using next generation sequencing. *Sexually Transmitted Infections*, 93(1), 65–67. DOI: <https://doi.org/10.1136/sextrans-2015-052422>

Hu, M., Nandi, S., Davies, C., & Nicholas, R. (2005). High-Level Chromosomally Mediated Tetracycline Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Results from a Point Mutation in the *rpsJ* Gene Encoding Ribosomal Protein S10 in Combination with the *mtrR* and *penB* Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4327–4334. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4327-4334.2005>

Huneeus, A., Schilling, A., & Fernandez, M. (2018). Prevalence of Chlamydia Trachomatis, *Neisseria Gonorrhoeae*, and *Trichomonas Vaginalis* Infection in

Chilean Adolescents and Young Adults. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 31(4), 411–415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2018.01.003>

Hunneus-Vergara, A., Soriano-Brücher, H., Pommer-Tellez, R., Delpiano-Méndez, L., Salas-Pacheco, F., Céspedes-Pino, P., & Schulín-Zeuthen, C. (2018). Chlamydia trachomatis: fundamentos de la importancia del cribado en el sistema público de salud. *Revista Chilena de Infectología*, 35(5), 498–500. Recuperado de: <https://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/247/104>

Irina, E., Vereshchagin, V., Borovskaya, A., Malakhova, M., Sidorenko, S., Al-Khafaji, N., Kubanova, A., & Govorun, V. (2008). Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 2175–2182. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01420-07>

Instituto de Salud Pública. (2019). Vigilancia de *Neisseria gonorrhoeae* Chile, 2010-2018. Recuperado de: [https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnGonorraea-27402020B\\_FINAL\\_web.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnGonorraea-27402020B_FINAL_web.pdf)

Jaiswal, A., Tiwari, S., Jamal, S., de Castro Oliveira, L., Alves, L., Azevedo, V., Ghosh, P., Oliveira, C., & Soares, S. (2020). The pan-genome of *Treponema pallidum* reveals differences in genome plasticity between subspecies related to venereal and non-venereal syphilis. *BMC Genomics*, 21(33), 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6430-6>

Kerndt, P., Ferrero, D., Aynalem, G., Monga, D., Wang, S., Zhang, N., Wong, C., Liggins, M., & Meng, Q. (2011). First Report of Performance of the Versant CT/GC DNA 1.0 Assay (kPCR) for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1347–1353. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01634-10>

Kivata, M., Mbuchi, M., Eyase, F., Bulimo, W., Kyanya, C., Oundo, V., Muriithi, S., Andagalu, B., Mbinda, W., Soge, O., McClelland, R., Sang, W. & Mancuso, J. (2019). *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Kenya. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1439-1>

- Kreisel, K., Spicknall, I., Gargano, J., Lewis, F., Lewis, R., Markowitz, L., Roberts, H., Johnson, A., Song, R., Cyr, S., Weston, E., Torrone, E., & Weinstock, H. (2021). Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates, 2018. *Sexually Transmitted Diseases*, 48(4), 208–214. DOI: <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001355>
- Kuiper, I. (2016). Microbial forensics: next-generation sequencing as catalyst. *EMBO Reports*, 17(8), 1085–1087. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201642794>
- Liao, M., Bell, K., Gu, W., Yang, Y., Eng, N., Fu, W., Wu, L., Zhang, C., Chen, Y., Jolly, A., & Dillon, J. (2008). Clusters of circulating *Neisseria gonorrhoeae* strains and association with antimicrobial resistance in Shanghai. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 478–487. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm544>
- Liao, M., Gu, W., Yang, Y., & Dillon, J. (2011). Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), 1016–1023. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr021>
- Liu, H., Tang, K., Pham, C., Schmerer, M., Kersh, E., & Raphael, B. (2022). Characterization of a *Neisseria gonorrhoeae* Ciprofloxacin panel for an antimicrobial resistant Isolate Bank. *PLOS ONE*, 17(3), 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264149>
- Lucas, C., Balthazar, J., Hagman, K., & Shafer, W. (1997). The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4123–4128. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.179.13.4123-4128.1997>
- Marchese, A. & Debbia, E. (2016). The role of *gyrA*, *gyrB*, and *dnaA* functions in bacterial conjugation. *Annals of Microbiology*, 66(1), 223–228. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1098-x>
- Ministerio de Salud. (2019). BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO TRIMESTRAL: GONORREA. Recuperado de: [http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/01/BET\\_GONORREA\\_2019.pdf](http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/01/BET_GONORREA_2019.pdf)

- Ministerio de Salud. (s.f.). Chlamydia. Consultado el día 11 de octubre de 2022. Recuperado de: <https://diprece.minsal.cl/temas-de-salud/temas-de-salud/chlamydia/>
- Ministerio de Salud. (s.f.). Gonorrea. Consultado el día 11 de octubre de 2022. Recuperado de: <https://diprece.minsal.cl/temas-de-salud/temas-de-salud/gonorrea/>
- Ministerio de Salud. (s.f.). HISTORIA DEL INSTITUTO MÉDICO LEGAL DE CHILE. Consultado el día 8 de septiembre de 2022. Recuperado de: <http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wp-content/uploads/2016/12/Historia-Servicio-M%C3%A9dico-Legal-y-Morgue.pdf>
- Ministerio de Salud. (2019). INFORME SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE GONORREA Y SÍFILIS CHILE, 2018. Recuperado de: [http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/05/Situacion\\_gonorrea\\_y\\_s%C3%ADfilis\\_2018.pdf](http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/05/Situacion_gonorrea_y_s%C3%ADfilis_2018.pdf)
- Ministerio de Salud. (2016). NORMA GENERAL TÉCNICA PARA LA ATENCIÓN DE VÍCTIMAS DE VIOLENCIA SEXUAL. Recuperado de: [http://www.repositoriodigital.minsal.cl/bitstream/handle/2015/825/NT\\_VICTIMAS-VIOLENCIA-SEXUAL\\_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.repositoriodigital.minsal.cl/bitstream/handle/2015/825/NT_VICTIMAS-VIOLENCIA-SEXUAL_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Ministerio de Salud. (s.f.). Sífilis. Consultado el día 11 de octubre de 2022. Recuperado de: <https://diprece.minsal.cl/temas-de-salud/temas-de-salud/sifilis/>
- Morgan, R. (2019). Forensic science. The importance of identity in theory and practice. *Forensic Science International: Synergy*, 1(1), 239–242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2019.09.001>
- Morrison, J., Watts, G., Hobbs, G., & Dawnay, N. (2018). Field-based detection of biological samples for forensic analysis: Established techniques, novel tools, and future innovations. *Forensic Science International*, 285, 147–160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.02.002>
- Murch, R. & Budowle, B. (2020). An international microbial forensics research strategy and its collaborative pursuit is needed. (Third Edition). Academy Press

- Murillo, J., Mendiburo-Seguel, A., Santelices, M., Araya, P., Narváez, S., Piraino, C., Martínez, J., y Hamilton, J. (2021). Abuso sexual temprano y su impacto en el bienestar actual del adulto. *Psicoperspectivas. Individuo y Sociedad*, 20(1), 1–13. DOI: <https://doi.org/10.5027/psicoperspectivas-Vol20-Issue1-fulltext-2043>
- National Research Council. (s.f.). Science needs for microbial forensics: developing initial international research priorities. The National Academics Retrieved.
- Nicol, M., Whiley, D., Nulsen, M., & Bromhead, C. (2014). Direct detection of markers associated with *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in New Zealand using residual DNA from the Cobas 4800 CT/NG NAAT assay. *Sexually Transmitted Infections*, 91(2), 91–93. DOI: <https://doi.org/10.1136/sextrans>
- NCBI (s.f.) Nucleotide sequence of gen *mtrR*. Consultado el 30 de marzo de 2023. Recuperado de: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_2319100375](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_2319100375)
- Olsen, B., Lan, P., Golparian, D., Johansson, E., Khang, T., & Unemo, M. (2013). Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Vietnam, 2011. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-40>
- Ortiz Á., Santander P., & Lugo P. (2021). *Neisseria gonorrhoeae*: un patógeno díscolo. Conceptos microbiológicos, resistencia a antimicrobianos y su vigilancia epidemiológica en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 38(4), 512–522. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000400512>
- Policía de Investigaciones de Chile (PDI). (2021). Delitos sexuales: balance primer trimestre 2021. Consultado el día 27 de septiembre de 2022. Recuperado de: <https://www.pdichile.cl/centro-de-prensa/detalle-prensa/2021/05/12/delitos-sexuales-balance-primer-trimestre-2021>
- Qin, X., & Melvin, A. (2020). Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections in Cases of Suspected Child Sexual Abuse. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(2), 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01433-19>
- Revista de Ciencias Penales. (2018). VIOLACIÓN IMPROPIA Y ABUSO SEXUAL. Recuperado de: <http://revistadecienciaspenales.cl/wp->

content/uploads/2019/04/okRevista-Chilena-de-Derecho-completa-26.03-821-831.pdf

- Rodríguez, L. (2022). DELITOS SEXUALES (Tercera edición). Jurídica de Chile.
- Sagong, B., Baek, J., Oh, S., Na, K., Bae, J., Choi, S., Jeong, J., Choi, J., Lee, S., Lee, K. & Kim, U. (2013). A Rapid Method for Simultaneous Screening of Multi-Gene Mutations Associated with Hearing Loss in the Korean Population. *PLoS ONE*, 8(3), 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057237>
- Sathirareuangchai, S., Phuangphung, P., Leelaporn, A., & Boon-Yasidhi, V. (2014). The usefulness of *Neisseria gonorrhoeae* strain typing by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and DNA detection as the forensic evidence in child sexual abuse cases: a case series. *International Journal of Legal Medicine*, 129 (1), 153–157. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1007-z>
- Serra-Pladevall, J., Gulin Blanco, C., Vila Olmo, N., Arjona Camacho, P., & Andreu Domingo, A. (2018). Preservation of *Neisseria gonorrhoeae*: should swabs be refrigerated or not?. *Journal of Microbiological Methods*, 145(1), 37–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.12.012>
- Servicio Médico Legal. (2022). Anuario Estadístico Sexología Forense (2006-2021). Recuperado de: <https://www.sml.gob.cl/wp-content/uploads/2022/05/Anuario-Sexologia-2006-2021.pdf>
- Servicio Médico Legal. (s.f.). Historia SML. Consultado el 8 de septiembre de 2022. Recuperado de: <https://www.sml.gob.cl/index.php/nuestra-historia/>
- Shaskolskiy, B., Dementieva, E., Leinsoo, A., Petrova, N., Chestkov, A., Kubanov, A., Deryabin, D., & Gryadunov, D. (2018). Tetracycline resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia, 2015–2017. *Infection, Genetics and Evolution*, 63(1), 236–242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.003>
- Singh, S. (2019). *Diagnostics to Pathogenomics of Sexually Transmitted Infections*. Wiley Blackwell.
- Tang, Y., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., & Schwartzman, J. (2015). *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Academic Press.

- Unemo, M., Golparian, D., Sánchez-Busó, L., Grad, Y., Jacobsson, S., Ohnishi, M., Lahra, M., Limnios, A., Sikora, A., Wi, T., & Harris, S. (2016). The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(11), 3096–3108. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw288>
- Unemo, M., Jacobsson, S., Spiteri, G., Cole, M., Tripodo, F., Harris, S., & Aanensen, D. (2018). Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* - a study of 2013 isolates. Recuperado de: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Molecular-typing-N-gonorrhoeae-web.pdf>
- Unemo, M., Olcén, P., Berglund, T., Albert, J., & Fredlund, H. (2002). Molecular Epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae*: Sequence Analysis of the *porB* Gene Confirms Presence of Two Circulating Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3741–3749. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3741-3749.2002>
- Vidovic, S., Horsman, G., Liao, M., & Dillon, J. (2011). Influence of conserved and hypervariable genetic markers on genotyping circulating strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS ONE*, 6(12), 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028259>
- Williams, D. & Gibson, G. (2019). Classification of individuals and the potential to detect sexual contact using the microbiome of the pubic region. *Forensic Science International: Genetics*, 41(1), 177–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.05.004>
- Workowski, K., Bachmann, L., Chan, P., Johnston, C., Muzny, C., Park, I., Reno, H., Zenilman, J., & Bolan, G. (2021). Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(4), 1–187. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7004a1>
- World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety manual. Recuperado de: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

World Population Review. (2022). Rape Statistics by Country 2022. Consultado el día 27 de septiembre de 2022. Recuperado de: <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/rape-statistics-by-country>

Xia, M., Whittington, W., Holmes, K., Plummer, F., & Roberts, M. (1995). Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Genomic Analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 171(1), 455-458. DOI: 10.1093/infdis/171.2.455

Zamboni, M., Ralph, C., García, P., & Cuello, M. (2016). La prevalencia actual de infección genital por *Chlamydia trachomatis* en adolescentes y mujeres jóvenes chilenas asintomáticas justifica la vigilancia periódica. *Revista Chilena de Infectología*, 33(6), 619–627. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000600003>

## V. HIPÓTESIS

“La detección de los sitios polimórficos de los marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *Neisseria gonorrhoeae*, a través de la técnica de minisequenciación, permiten establecer un vínculo entre víctima y sospechoso en casos de violación”.

## VI. OBJETIVOS

### Objetivo General:

Implementar un método de análisis de los sitios polimórficos de los marcadores genéticos *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ* de *Neisseria gonorrhoeae* en muestras biológicas que permitan establecer un vínculo entre víctima y sospechosos en casos de violación.

### Objetivos Específicos:

1. Determinar las condiciones iniciales de las muestras biológicas obtenidas de casos de violación, con características conocidas de *Neisseria gonorrhoeae*, para generar una base de datos inicial, a partir de los serotipos circulantes en Chile.
2. Determinar un método de análisis genético para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* de muestras biológicas obtenidas de casos de violación.

## VII. METODOLOGÍA

### Objetivo 1.

**Determinar las condiciones iniciales de las muestras biológicas obtenidas de casos de violación, con características conocidas de *Neisseria gonorrhoeae*, para generar una base de datos inicial, a partir de los serotipos circulantes en Chile.**

#### **1. PROCESAMIENTO INICIAL DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN CASOS DE VIOLACIÓN, CON CARACTERÍSTICAS CONOCIDAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE***

Para generar una base de datos inicial, a partir de los 14 serotipos circulantes de *Neisseria gonorrhoeae* en Chile, se realiza un análisis de frecuencia genotípica a partir de 80 tómulas o hisopos de muestras de hisopado genital con concentraciones de *Neisseria gonorrhoeae* conocidas, facilitadas por el Instituto de Salud Pública de Chile. Se toman 5 muestras de cada una de ellas. En estudios previos, se determinó que para conseguir una adecuada identificación de esta bacteria la tómula “completa” debe estar en un medio húmedo, debido a que *Neisseria* es un microorganismo muy sensible a los factores ambientales, por lo que se recomienda que al momento de su recolección y transporte de la muestra debe ser en hisopos húmedos (Minsal, 2016; Serra-Pladevall et.al, 2018). Además, es probable que el tamaño de la tómula varíe, ya que existen casos en que se utilizó la tómula para otros procedimientos, por lo que se puede disponer de la mitad, un cuarto o tres cuartos del hisopo. Asimismo, se debe considerar el almacenamiento de esta bacteria, donde si es a corto plazo su análisis, se recomienda conservar a 4°C (Serra-Pladevall et.al, 2018), pero si su almacenamiento será de más de 72 hrs, se recomienda almacenar en un medio de tripticasa de soya con glicerol al 15% en nitrógeno líquido, o mantenerse en un congelador a -70°C (Ortiz, Santander y Lugo, 2021). Del mismo modo, se debe considerar que esta bacteria debe manipularse de acuerdo con el Nivel 2 de Bioseguridad correspondiente a la Clasificación Internacional de Riesgo (World Health Organization, 2020).

Posteriormente de definir los parámetros mencionados, las muestras se analizan, en una primera instancia, con la técnica NAAT de tipo PCR, donde se miden las tómulas a diferentes concentraciones de *Neisseria gonorrhoeae* en presencia del marcador *porB1b*, para definir un rango de concentraciones adecuadas de este microorganismo, en que se logre identificar nítidamente esta bacteria en la electroforesis en gel de agarosa (Unemo et.al, 2002). Luego, para determinar el tipo de variante de *Neisseria gonorrhoeae* en los marcadores *mtrR*, *gyrA* y *rpsJ*, se realiza la técnica de minisequenciación en estas mismas muestras, que permitan verificar la frecuencia genotípica en la población chilena de estos marcadores, al realizar un estudio poblacional con estas muestras (Unemo et.al, 2018). Para ambas técnicas se utiliza como control positivo ADN de una cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* que será proporcionada por el ISP y como control negativo agua destilada.

## **Objetivo 2.**

**Determinar un método de análisis genético para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* de muestras biológicas obtenidas de casos de violación.**

### **1. PROCESO DE TOMA DE MUESTRA EN VÍCTIMAS DE VIOLACIÓN**

Se recolecta muestras de víctimas de violación en la unidad de sexología del SML como material biológico como hisopados genitales (secreciones), muestras de sangre, orina y saliva. Primero se analiza la presencia del ADN humano del sospechoso. Si esta prueba es negativa, se realizará un análisis microbiológico forense en hisopados genitales para determinar la presencia de ITS, que, en este caso, será *Neisseria gonorrhoeae* (Ortiz, Santander y Lugo, 2021). La toma de muestras se realiza mediante un acta de consentimiento y será aprobado por el comité de Bioética (formato del acta de consentimiento en Anexo), para reservar la privacidad de los datos de la víctima (Minsal, 2016).

Se recomienda que la recolección de la muestra se realice antes de cumplirse las 72 horas, para obtener evidencia suficiente y permitir mejores resultados. En víctimas cuya historia revela que la agresión ocurrió con data mayor a las 72 horas, corresponde realizar

una toma de muestra de hisopado vaginal para detectar la presencia de algún microorganismo en la víctima y realizar un completo examen físico para determinar lesiones extra e intra genitales más la recolección de la ropa interior al momento de la agresión si no ha sufrido algún lavado. En caso de que la víctima fuese mayor de edad y decidiera no denunciar en el momento que ocurrió la violación, se debe tomar muestras de todas formas y guardar en un lugar previamente determinado, bajo medidas de seguridad hasta un año aproximadamente, período en el cual, la víctima puede realizar la denuncia y la Fiscalía pueda solicitar las muestras (Minsal, 2016).

## 2. IDENTIFICACIÓN DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* CON MARCADORES GENÉTICOS

Se analiza los marcadores genéticos polimórficos de varios genes de *N. gonorrhoeae* que codifican para enzimas del metabolismo intermediario, para lo cual se seleccionan 4 genes que son *porB1b*, *rpsJ*, *gyrA* y *mtrR*. La secuencia de los partidores de estos marcadores se encuentra resumida en la Tabla 1. La secuencia de los primers se obtiene de artículos científicos. Los partidores de *porB1b* fueron descritos en Liao et.al (2008), donde solo incluyó un 85% de la secuencia del gen bacteriano; para *gyrA* se obtiene de Deguchi et.al (1995), en que se requirió solo el 45 % de la secuencia del gen bacteriano; para *mtrR* se utiliza los partidores que se usaron en Lucas et.al (1997), que solo requirió el 40% de la secuencia del gen de la bacteria; y los partidores de *rpsJ* se adquieren de Ilina et.al (2008), en el cual se utiliza solo una parte de la secuencia del gen de esta bacteria (alrededor del 25 %).

**Tabla 1: Secuencia de partidores que se utilizan para identificar los genes *mtrR*, *gyrA*, *rpsJ* y *porB1b* de *Neisseria gonorrhoeae* mediante PCR.**

Gen	Forward primer 5´a 3´	Reverse primer 5´a 3´	Longitud del amplicón (pb)
<i>mtrR</i>	GCCAATCAACAGGCATTCTTA	GTTGGAACAACGCGTCAAAC	401
<i>gyrA</i>	GACGGCCTAAAGCCGGTGCA	ATGTTGGTCGCCATACCGAC	431
<i>rpsJ</i>	GTGCTGTTGTAAAAGGCCCG	CGGCCGGCAAATCCAGCTTC	186
<i>porB1b</i>	CCGGCCTGCTTAAATTTCTTA	TATTAGAATTTGTGGCGCAG	873

## 2.1 Técnica de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) de tipo PCR

Para la técnica NAAT, se utiliza el sistema Siemens VERSANT GC DNA 1.0 (kPCR), que es completamente automatizado y permite la extracción, amplificación y detección de ADN de *N.gonorrhoeae*, utilizando como marcador genético principal de esta bacteria a *porB1b* (Kerndt et al., 2011).

Luego, en la extracción y purificación del ácido nucleico de la muestra, se añade proteinasa K para eliminar las proteínas unidas al ADN, un tampón de lisis caotrópica para inactivar ADNasas y lisar las partículas bacterianas. Luego, se agrega perlas de sílice magnéticas para capturar los ácidos nucleicos y extraer el ADN. La mezcla se incubará a 62°C durante 15 minutos. Las perlas de sílice magnéticas con ADN capturado de *Neisseria gonorrhoeae*, se lava mediante 3 series de lavado con etanol, para eliminar los componentes restantes de la muestra. El ADN purificado se eluye con tampón de elución para separar el ADN de las perlas de sílice y se incuba a 74°C durante 10 minutos (Kerndt et al., 2011).

La cuantificación de los extractos de ADN obtenidos de la muestra se realiza por espectrofotometría con un equipo Nanodrop a una longitud de onda de 260 nm, aplicando la fórmula de ley de Lambert-Beer para estimar la concentración de ADN. La pureza del ADN se evalúa mediante la razón de absorbancia de A260/A280, en que se considera un ADN de buena calidad cuando es mayor a 1,8 y menor a 2 (Kerndt et al., 2011).

Después, se añade el producto eludido a una placa de PCR de 96 pocillos que contiene una mezcla de primers-sonda de *Neisseria* y la mezcla de enzimas proporcionadas en el sistema Versant DNA 1.0 (kPCR) (Kerndt et al., 2011). Luego, se lleva a cabo la amplificación por PCR en tiempo real, donde se usa ADN genómico como molde y los partidores de oligonucleótidos que están descritos en la Tabla 1. La amplificación se hace bajo las condiciones que se indican en Ilna et.al (2008), a una mezcla de reacción de que contenía una concentración de 66mM Tris-HCl para estabilizar el pH de la solución; 16,6 mM SO<sub>4</sub> para precipitar el ADN; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> que actúa como cofactor enzimático de la polimerasa; 0,2mM de cada dNTP para generar las nuevas cadenas de ADN; 5 pmol de cada partidor para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará y 1 unidad de polimerasa *Taq* para duplicar el ADN molde. Luego, de realizar la mezcla de PCR, se

lleva a un termociclador con las siguientes condiciones: 94 °C durante 20 s, 60 °C durante 20 s y 72 °C durante 15 s durante 35 ciclos. Los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Ilina et.al, 2008), para detectar la presencia de este microorganismo.

## **2.2 Minisequenciación de marcadores genéticos polimórficos**

La PCR se realiza como se describió anteriormente, utilizando los conjuntos de partidores enumerados en la Tabla 1. La desfosforilación de los grupos fosfato del extremo 5' de los dNTP en la mezcla de reacción posterior a la amplificación, se lleva a cabo mediante la incubación con 0,5 unidades de fosfatasa alcalina, durante 20 min a 37 °C, seguida de la inactivación de la enzima a través de calor 10 min a 85°C (Ilina et.al, 2008).

Las reacciones de minisequenciación se genera con los amplicones de todos los genes de interés que se observan en la Tabla 2, obtenidos de Ilina et.al por PCR convencional con los primers diseñados para cada SNP en particular (Ilina et.al, 2008).

Las reacciones de extensión de los partidores se generan bajo las condiciones que se indican en Ilina et.al (2008) con pequeñas modificaciones que se denota en Fiorentino et.al (2003). La mezcla de PCR será de 20 µl de mezcla de reacción, que contiene 66mM Tris-HCl; 16,6 mM SO<sub>4</sub>; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de un solo didesoxinucleótido fluorescente (ddNTP) que es importante porque se complementa con los genes de interés; 10 pmol de cada primers interno respectivo y 2 unidades de ADN polimerasa (TermiPol) para generar la extensión de los partidores (polimerización). Luego, de realizar la mezcla de PCR, se lleva a un termociclador con las siguientes condiciones: 94 °C durante 20 s, 58 °C durante 20 s y 72 °C durante 15 s durante 70 ciclos. Este proceso va a generar los fragmentos de los genes marcados con fluorescencia para su análisis. Después de la reacción de extensión del primers, se mezcla el producto de minisequenciación con Hi-Di Formamide para suspender las muestras, y luego se desnaturalizará durante 4 min a 90 °C. Posteriormente, para revelar los datos de la electroforesis, se analiza la señal de cada pico en un electroferograma con el software de análisis GeneScan® (Applied Biosystems); donde el color del tinte del fragmento se utiliza para identificar el nucleótido

de interés. Para la técnica de minisequenciación, el color se asigna a cada ddNTP de la siguiente manera: verde/A, negro/C, azul/G, rojo/T.

**Tabla 2: Secuencia de primers de cada gen para minisequenciación (Modificado de Iliina et.al, 2008).**

Gen	Forward primer 5' a 3'	Reverse primer 5' a 3'
<i>mtrR</i>	ACATACACGATTGCACGGAT	TGAAATGCCAATAGAGCGCG
<i>gyrA</i>	ATACCACCCCCACGGCGATT	CGCCATACGGACGATGGTGG
<i>rpsJ</i>	ACATTTTCCGTTCTCCGCAC	CGGCCGGCGAATCCAGCTTC

### 2.3 Análisis estadístico

El análisis de minisequenciación se realiza mediante una distribución binomial con intervalo de confianza al 95% (Fiorentino et.al, 2003).

## VIII. PLAN DE TRABAJO

Objetivos Específicos	Meses						
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
<b>1. Determinar las condiciones iniciales de las muestras biológicas obtenidas de casos de violación, con características conocidas de <i>Neisseria gonorrhoea</i>, para generar una base de datos inicial, a partir de los serotipos circulantes en Chile.</b>							
A) Procesamiento inicial de muestras biológicas en casos de violación, con características conocidas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .							
<b>2. Determinar un método de análisis genético para la detección de <i>Neisseria gonorrhoea</i> en muestras biológicas obtenidas de casos de violación.</b>							
A) Proceso de toma de muestra en víctimas de violación.							
B) Identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> con marcadores genéticos en técnica de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) de tipo PCR y minisequenciación.							
<b>Redacción escrito final</b>							

**IX. TRABAJO ADELANTADO POR INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE**

NO APLICA

**X. RECURSOS DISPONIBLES**

NO APLICA

**XI. DETALLE Y JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS.**

<b>Servicio Médico Legal, Unidad de Genética Forense</b>
<b>Universidad/Facultad/Departamento</b>

**XI.1. DETALLE DE LOS RECURSOS SOLICITADOS**

NO APLICA

**XI.2. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:**

Justifique los montos solicitados para cada año de ejecución en cada uno de los ítems. No se considerarán solicitudes sin una adecuada justificación. Asegúrese que los montos totales de cada ítem coincidan con los ingresados en la tabla Detalle de los Recursos Solicitados. El máximo para solicitar incluyendo todos los ítems es de \$ 30.000.000.

NO APLICA

- **PERSONAL TÉCNICO Y/O DE APOYO:**

Describa claramente, si corresponde, las funciones del **personal técnico y/o de apoyo** para los cuales solicita financiamiento. Este debe estar directamente relacionado con el logro de los objetivos del proyecto. Por ejemplo: Laboratoristas, ayudantes de programación, etc. No incluya en este ítem, recursos para la contratación de personal ocasional, ejemplo: traducción de documento.

NO APLICA

- **BECAS PARA TESISTAS/ MEMORISTAS:**

Informe las tesis de pre y postgrado que pretende financiar a través del proyecto.

NO APLICA

- **VIAJES PARA EL PROYECTO:**

- **VIAJES AL EXTRANJERO DEL PROYECTO:**

Solo se aceptarán pasajes en **clase económica**. Para más información consulte las **Instrucciones** para postular.

NO APLICA

- **VIAJES NACIONALES DEL PROYECTO:**

En la justificación de las salidas a terreno, asistencia a reuniones científicas nacionales y viajes dentro del país, incluya el medio de transporte a utilizar. Para más información consulte las **Instrucciones** para postular.

NO APLICA

- **VIAJES COOPERACIÓN INTERNACIONAL:**

Justifique su solicitud de recursos para actividades de cooperación internacional. Indique de qué manera su propuesta se verá fortalecida en el logro de sus objetivos al invitar a un(a) investigador(a) residente en el extranjero. Recuerde que solo se aceptarán pasajes en clase económica. Para más información consulte las **Instrucciones** para postular.  
Justificación (para cada año)

NO APLICA

- **GASTOS DE OPERACIÓN:**

Indique en la siguiente tabla, el costo anual estimado para cada uno de los subítem necesarios para una exitosa ejecución del proyecto. Inserte tantas filas como requiera.  
**Justifique su solicitud en el espacio provisto.**

**Tabla 3: Gastos de operación**

Subítem	Total (miles de \$)	
	Semestre 1	Semestre 2
Artículos de Oficina	200	100
Insumos Computacionales	500	100
Reactivos e Insumos de laboratorio	256.673	126.086
Adquisición de libros, revistas, suscripciones y membresías	0	0
Inscripciones en congresos	0	0
Compra de servicios	0	0
Contratación de personal auxiliar ocasional y obrero	0	0
Costo publicaciones científicas	0	0
Software y licencias	520	520
Costo de Encuestas	0	0
Costo Focus Group	0	0
Actividad(es) de Difusión a público general	0	0
Otros (especificar)	0	0
<b>TOTAL:</b>	<b>257.893</b>	<b>126.806</b>

**Fundamente su solicitud:**

Al abrir un “**nuevo laboratorio**” en el **SML**, en este caso de microbiología forense, se debe considerar **todos** los recursos necesarios para poder implementarlo y que pueda comenzar su funcionamiento a través de una **estimación inicial de costo**, según el **presupuesto económico** que disponga el SML para ejecutar este proyecto.

- **Artículos de oficina:** Este ítem incluye impresora, hojas blancas tamaño carta, tinta para impresiones, y materiales de oficina en general como lápices, marcadores, corchetes, etc.

- **Insumos computacionales:** Este ítem considera la adquisición de un computador para utilizar el software requerido para el análisis estadístico y considerar su mantenimiento.
- **Reactivos e insumos de laboratorio:** Para la realización de la metodología propuesta, este ítem incluye: Reactivos y materiales para almacenamiento *Neisseria gonorrhoeae*; sistema Siemens VERSANT GC DNA 1.0 (kPCR); Kits de extracción, purificación y cuantificación; equipo de espectrofotometría Nanodrop; Kits para reacciones de PCR y equipo termociclador de 96 pocillos; sistema de electroforesis capilar; enzima fosfatasa alcalina; Kits de extensión de primers; Hi-Di Formamide; contenedores de nitrógeno; máquinas centrifugas; refrigeradores -70°C; campanas de extracción; material y gabinetes de bioseguridad; kits de micropipetas de 10-100-200-1000 uL; insumos plásticos, de limpieza u otros.
- **Software y licencias:** Para la obtención de resultados de minisequenciación, se utiliza el software (con su respectiva licencia) de análisis de GeneScan® de Applied Biosystems. Además, se debe tener en cuenta la licencia Microsoft, como adicional, por si se requiere para algún análisis.

- **BIENES DE CAPITAL:**

Cada uno de los bienes solicitados requiere una clara justificación con respecto a los objetivos y metodología propuesta. Describa detalladamente las características, componentes y especificaciones técnicas de cada uno de ellos, indicando el nombre del proveedor consultado. El monto solicitado debe incluir los costos de transporte, flete, seguros, IVA y derechos de internación. No incluya en este ítem equipamiento menor no inventariable, incluido elementos informáticos.

Se permite la compra de mobiliario y/o acondicionamiento menor de espacios físicos que correspondan a la naturaleza y ejecución adecuada del proyecto.

**Fundamente su solicitud:**

NO APLICA

## XII. ANEXOS

- **CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO, PROTOCOLO ANIMAL, CERTIFICADOS DE ÉTICA/BIOÉTICA, BIOSEGURIDAD, PERMISOS Y OTROS**, si corresponde: Si las certificaciones/Autorizaciones se encuentran en proceso, el(la) postulante debe indicar en la sección Objeto de Estudio esta situación.

**Carta de Consentimiento Informado** (Recuperado de Minsal, 2016):

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y TOMA DE MUESTRA N° _____	
<b>I) Identificación de la persona a quien se tomará la muestra biológica</b>	
Nombre completo:	_____
Cedula de identidad:	_____ *Parentesco _____
Fecha Nacimiento:	_____ Nacionalidad: _____
Verificación de identidad:	Biometría <input type="checkbox"/> Ficha Decadactilar <input type="checkbox"/>
<b>II) <input type="checkbox"/> Sistema Nacional de Registro de ADN / Comparativo de ADN <input type="checkbox"/></b>	
Condenados <input type="checkbox"/>	Imputados <input type="checkbox"/>   Víctimas <input type="checkbox"/>   Familiares <input type="checkbox"/>   Otros: <input type="checkbox"/>
de Personas Perdidas _____	
Notificación/Oficio N° _____ del _____.-	
<b>III) Consentimiento Informado</b>	
En este acto consiento proporcionar una muestra biológica a fin de que se determine mi huella genética, según se ordene ya sea ingresar con posterioridad al registro correspondiente según lo establecido en la Ley 19.970 que crea el Sistema Nacional de Registros de ADN y/o quede disponible para análisis comparativos de ADN.	
Así mismo, declaro que en este mismo acto y previo al procedimiento de toma de muestra biológica que se me informa que el Sistema Nacional de Registros de ADN tiene carácter reservado, la información contenida en él sólo puede ser directamente consultada por el Ministerio Público y los Tribunales de Justicia, y que bajo ningún supuesto el sistema podrá constituir base o fuente de discriminación, estigmatización, vulneración de la dignidad, intimidad, privacidad o de la honra.	
Por último se me informa que la Ley antes señalada y sólo para los registros de condenados e imputados, en caso de negativa de acceder a la toma de muestra dicha negación será puesta en conocimiento del Tribunal de Justicia.	
Habiéndose señalado lo anterior, manifiesto y reafirmo mi consentimiento y conformidad con la toma de mi muestra biológica para los fines ya descritos, firmando e imprimiendo mi huella dactilar en señal de aceptación.	
_____	_____
Firma	Impresión dactilar
Observaciones: _____	

<b>IV) Identificación de la muestra biológica</b>			
Tipo de Muestra:	_____	N.U.E.	_____
Fecha:	_____	Hora:	_____
<b>V) Completar en caso de rechazo, indicando el motivo.</b>			
Manifiesto mi voluntad de rechazar la toma de mi muestra biológica, firmando y/o imprimiendo mi huella dactilar e indicando el motivo.			
Motivo del Rechazo: _____			
_____		_____	
Firma		Impresión dactilar	
<b>VI) Identificación del funcionario</b>			
_____		_____	
<b>Firma Funcionario Toma de Muestra</b>		<b>Firma Funcionario 2</b>	
Nombre:		Nombre:	
R.U.N.:		R.U.N.:	
<small>*solo en caso de Registro de Personas Perdidas y sus Familiares.</small>			

- **INSTITUTO ANTÁRTICO CHILENO - PROYECTOS EN LA ANTÁRTICA**, si corresponde: El(La) postulante debe adjuntar el “Certificado Cumplimiento Normativa Ambiental” y “Carta de Certificación Logística”.

NO APLICA

- **CERTIFICACIÓN DE PUBLICACIONES ACEPTADAS/EN PRENSA**, si corresponde: El(La) postulante debe anexar cartas, correos electrónicos u otros que acrediten por parte de la revista/comité editorial, el estado del manuscrito.

NO APLICA

- **COTIZACIONES, FACTURAS PRO-FORMA Y OTROS DOCUMENTOS**, El(La) postulante debe anexar manuscritos en proceso de revisión, cotización(es) del(de los) bien(es), insumos y reactivos a adquirir, carta de compromiso de instituciones colaboradoras, entre otros.

NO APLICA