DEPARTAMENTO DE ORGANISMO DE INVES PODER JUDICI PROCEDIMIENTO PA DE MARCADORES REACCIÓN EN CADER	E CIENCIAS FORENSES TIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) IAL, COSTA RICA RA LA AMPLIFICACIÓN GENÉTICOS POR LA NA DE LA POLIMERASA	PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO <b>P-DCF-ECT-BQM-36</b>
Versión: 16 Rig	ge desde: 13/05/2025	PAGINA: 1 de <b>74</b>
Elaborado o modificado por:	Revisado por Líder	Γécnico:
Dra. Gabriela Ramírez Ramírez Profesional en Genética Forense Sección de Genética Forense	Dra. Anayanci Profesional en Líder Sección de Ge	Rodríguez Quesada Genética Forense Técnico nética Forense
Profesional en Genética Forense		
Visto Bueno Encargado de Calidad:	Apro	bado por:
Dr. Alejandro Hernández Bolaños Profesional en Genética Forense Encargado de Calidad Sección de Genética Forense	s Dra. Eugen Sección de	lia Fernández Mora Jefatura 2 Genética Forense



### **CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN**

	Fecha de	Fecha de	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado
Versión	Aprobación	Revisión			por
01	2015.08.17	2015.08.17	Versión Inicial del Procedimiento	-	-
02	2015.08.17	06/06/201	Revisión del PON	13-	EFM
		6		2015	
03	06/06/201	24/03/201	Revisión y cambio de formato 🔪	09-	EFM
	6	7		2016	
04	24/03/201	15/06/201	Lista Chequeo	30-	EFM
	7	7		2017	
05	15/06/201	10/08/201	Se eliminan puntos y se incluye	52-	EFM
	7	7	un kit	2017	
06	10/08/201	12/06/201	Revisión	66-	EFM
	7	8		2017	
07	12/06/201	26/02/202	Revisión y edición	10-	EFM
	8	1		2018	
08	26/02/202	22/06/202	Revisión y edición y uso	09-	EFM
	1	1	de Qiagility y HDplex	2021	
09	22/06/202	29/07/202	Modificaciones posteriores	22-	EFM
	1	1	a Auditoria Interna	2021	
10	29/07/202	28/02/202	Correcciones	39-	EFM
	1	3		2021	
11	28/02/202	10/11/2023	Correcciones, inclusión de kit	13-	EFM
	3		Yfiler Plus directo	2023	
12	10/11/2023	24/04/2024	Inclusión uso pipeteador	24-	ARQ
		K	automático Hamilton	2023	
13	24/04/2024	03/07/2024	Revisión y edición	11-	EFM
				2024	
14	03/07/2024	21/11/2024	Incluye uso y manejo de	17-	EFM
			perforador de tarjetas	2024	
15	21/11/2024	13/05/2025	Revisión y edición y cambio de	24-	ARQ
			nombre de Sección	2024	
16	13/05/2025		Revisión post Auditoria Interna	17-	EFM
				2025	

ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSION 10	PAGINA. 3 de 74
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE	P-DCF-EC	T-BQM-36

## 1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer la metodología para amplificar un fragmento de ADN mediante imprimadores, iniciadores o primers escogidos y aceptados y validados por la comunidad forense internacional a fin de lograr un perfil genético de un individuo o indicio y compararla con muestras de referencia.

## 2 Alcance:

Este PON se utiliza para amplificar ADN nuclear, Haplotipo de Cromosoma Y o Haplotipo de Cromosoma X, extraído de las muestras de casos penales y de paternidad.

## **3 Referencias:**

- Applied Biosystems. GlobalFiler PCR Amplification Kit. User's guide, 2015.
- Applied Biosystems. GlobalFiler Express PCR Amplification Kit. User's quide, 2014.
- Applied Biosystems. YFiler Plus PCR Amplification Kit. User's quide, 2014.
- Armed Forces DNA Identification Laboratory. Laboratory Cleaning and Decontamination. 1994.
- BSD Robotics. Manual de Usuario BSD600 ASCENT, 2021.
- BSD Robotics. Operator quidelines BSD600 Duet SEMIAUTOMATED Dried Sample Punch Instrument.
- Budowle B., Baechtel F., Comey F.S. and Catherine T. 1992. Some considerations for use of AmpliFLPs for identity testing. In: Advances in Forensic Haemogenetics 4. pp. 11-17.
- Butler, J., Forensic DNA Typing. Academic Press, 49-50, 2011.
- COASTAL HEALTHCARE. Bloodborne Pathogens. Virginia Beach, Va. USA, 1992.
- Informe de validación 006-BOM-2017. Sección de Genética Forense, DCF, 2017
- Informe de validación 004-BQM-VAL-2020. Sección de Genética Forense, DCF, 2020
- Informe de validación 001-BQM-VAL-2021. Sección de Genética Forense, DCF, 2021
- Informe de validación 003-BQM-VAL-2021. Sección de Genética Forense, DCF, 2021
- Informe de validación 004-BQM-VAL-2021. Sección de Genética Forense, DCF, 2021
- Informe de validación 005-BQM-VAL-2021. Sección de Genética Forense, DCF, 2021 •
- Informe de validación 003-BQM-VAL-2022. Sección de Genética Forense, DCF, 2022
- Informe de validación 001-BQM-VAL-2024. Sección de Genética Forense, DCF, 2024
- Innes, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85. 9436, 1988.
- Investigator Argus X-12 Handbook. QIAGEN. June 2013.
- Lawyer, F.C et all. 1989. Biol. Chem., 264, 6427.
- Manual de usuario de QIAgility, 2013. QIAGEN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 4 de 74

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACION DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

- NRC. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. pp: 82-84. Washington, D.C. National Academy Press. 1996.
- Promega. Technical Manual. PowerPlex CS7 System, 2010.
- Promega. Technical Manual. PowerPlex Fusion System, 2016.
- Qiagen Hdplex Handbook, QIAGEN, November 2012
- Saiki, R.K., et all. 1985. Science, 230, 1350, 1985.
- SWGDAM. Guidelines for Quality Assurance Program for DNA Analysis. Volume22, Number 2, pp:27. April 1995.
- Sambrook, Fritsch Maniatis. Molecular Cleaning. A Laboratory Manual, Second Edition, 1989. Cold spring.

## 4 Equipos y Materiales:

- Agitador tipo vortex o similar.
- Autoclave Modelo Rexall S3W-A capaz de generar 121 °C y 1,2 Kg/cm<sup>3</sup> de presión o similar.
- Balanza semi-analítica Mettler Toledo Mod PB3002-S 3100,00 ± 0,01 g o similar.
- Balón aforado de 1 litro.\*
- Beaker de 500 y 1000 mL de plástico o vidrio Pyrex.
- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, tamaño 8,5 x 11 cm o similar para desechar guantes y material contaminado con fluidos biológicos.
- Botellas de vidrio transparentes de 0,5 L y 1 L.\*
- Cabina estéril con luz ultravioleta de 254 nm o Cámara de flujo laminar.
- Cobertor para gradilla de microtubos de reacción MicroAmp (Perkin Elmer) o similar. \*
- Congelador con temperatura cercana a los -20 °C. (rango -18 a -23° C)
- Escarchadora.
- Formulario: "Registro de Condiciones de Temperatura de un equipo de congelación."
- Formulario: "Registro de Condiciones de Temperatura de un equipo de refrigeración."
- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense
- Gabacha desechable o Gabacha limpia.
- Gradillas para microtubos de reacción MicroAmp (Perkin Elmer) o similar. \*
- Guantes desechables.
- Hielera con hielo en escarcha.
- Manual de usuario Hamilton, modelo MicroLAB<sup>®</sup> NIMBUS, Applied Biosystems.
- Mascarilla o cubrebocas desechable.
- Micropipetas automáticas de volumen ajustable \*\*
- P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 5 de 74

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACION DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

- pH-metro. (rango de 0 a 14 +/- 0.01 pH)
- Pipeteador automático QIAgen, modelo QIAgility
- Pipeteador automático Hamilton, modelo Microlab<sup>®</sup> Nimbus
- Placas ópticas de 96 pozos, "MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate", Applied Biosystem, ref N8010560 o similar.
- Probetas de plástico o de vidrio Pirex. \*
- Puntas para micropipeteadores de 10uL, 200uL, 1000uL nuevas y estériles.
- Puntas conductivas nuevas (QIAgility, Nimbus o similar)
- Recipientes de material plástico rígido (polietileno o polipropileno), impermeable y
  resistente a la perforación, golpes o caídas, provistos preferiblemente de un sistema que
  impida extraer los objetos desechados, preferiblemente de color rojo e identificados con
  una etiqueta visible con la palabra "punzocortantes" acompañada del símbolo de
  biopeligrosidad.
- Refrigerador con temperatura cercana a los 4 °C. (rango 2 a 8 °C)
- Tarjetas de papel de filtro, "Stain cards", "BioScience" o "FTA cards" o similares nuevas, estériles y sobres manila #1.
- Termociclador Proflex Applied Biosystems o similar.
- Termociclador Veriti Applied Biosystems o similar.
- Toallas "Kimwipes."
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y 0,5 mL nuevos y estériles.
- Tubos de reacción para PCR 0,2 mL nuevos y estériles MicroAmp Perkin Elmer) o similar.

**Nota 1:** Las puntas para micropipetas y los tubos para microcentrífuga deben ser nuevos y autoclavados.

\* Utilice detergente Terg-A-Zyme al 1 %, para lavar materiales reutilizables, enjuague con agua de tubo eliminando rastros del jabón y enjuague tres veces con agua de tubo y una vez con agua tipo Milli-Q o similar, seque y prepare para autoclavar. (Ver: Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado)

\*\* Limpie la parte externa de las micropipetas con toallas suave desechables "Kimwipes" o similar, impregnada con DNA Away o similar y/o etanol de 70% o superior y deje secar a temperatura ambiente.

### 5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua tipo Milli-Q o similar estéril (ver: Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado)
- Agua tipo Milli-Q o similar
- Agua de tubo.
- AmpSolution Reagent 5X (Promega). Este reactivo ya viene preparado.

DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL,	VERSION 10	FAGINA. 0 de 74
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EORENSES ORCANISMO	VEDSTÓN 16	PAGINA: 6 do 74

### -DCF-ECI-BQM-36

- Buffer TE. (10mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8) (se adquiere comercialmente)
- Controles positivos de amplificación: K9947A, DNA Control 007 y 2800M
- Control positivo de extracción (muestra tipeada previamente), de una persona que no participe en el análisis.
- Descontaminante de ADN y ARNnasas, DNA Away Cat 7010 o similar.
- Detergente Terg-A-Zyme, Marca Alconox o similar (Ver Anexo Número 1)
- EDTA 0,5 M, pH 8, (Ver Anexo Número 01)
- Etanol al 70%, grado comercial.
- Etanol al 95% grado comercial.
- Hielo en escarcha.
- Investigator HDPlex (Qiagen):

Amelogenina, D7S1517, D3S1744, D12S391, D2S1360, D6S474, D4S2366. D8S1132, D5S2500, D18S51, D21S2055, D10S2325, SE33.

### Investigator Argus-X-12 (Qiagen):

DXS8378, DXS10074, DXS7132, DXS7423, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, y HPRTB.

- PowerPlex CS7 System. (CS7) (Promega): LPL, F13B, FESFPS, F13A01, Penta D, Penta C, Penta E.
- Yfiler Plus, Yfiler Plus direct. (Applied Biosystem) (\*):

DYS576, DYS389 I y II, DYS635, DYS627, DYS460, DYS458, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS456, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS570, DYS437, DYS385, DYS449, DYS393, DYS439, DYS481, DYF378S1, DYS533.

### GlobalFiler, GlobalFiler Express. (Applied Biosystem) (\*):

D3S1358, vWA, D16S539, CFS1P0, TPOX, Y Indel, AMELOGENINA, D8S1179, D21S11, D18S51, DYS391, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, DS12S391, D2S1338.

### **PowerPlex Fusion.** (Promega):

AMELOGENINA, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CFS1P0, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391, D8S1179, DS12S391, D19S433, FGA, D22S1045.

(\*) Reactivos críticos. Ver el punto 7.3.3 Reactivos y suministros críticos del PROCEDIMIENTO DE GESTIÓN DE CASOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS, UNIDAD DE GENÉTICA FORENSE, SECCIÓN DE GENÉTICA FORENSE, para referirse al proceso de verificación intermedia y de prueba de nuevos lotes de reactivos.

### 6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento de montaje de la amplificación debe realizarse en la zona designada para "Montaje de PCR" de la Unidad de Genética Forense.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 7 de 74
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	T-BQM-36

Los refrigeradores deben mantener temperaturas entre 2 a 8° C +/- 2° C y los congeladores entre -15 a -25° C +/- 2° C.

La temperatura del congelador y/o refrigerador debe ser registrada al menos una vez al día y debe registrarse en el Formulario: "Registro de Condiciones de Temperatura de equipos de congelación" y/o "Registro de Condiciones de Temperatura de equipos de refrigeración".

### 7 Procedimiento:

#### 7.1 Montaje de la prueba:

**Nota 2:** Se debe completar el "Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense" como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

- **7.1.1** Asegúrese, antes de comenzar a trabajar de que haya suficiente material limpio y autoclavado (puntas, tubos para PCR, gradillas, cobertor para gradilla, etc).
- **7.1.1.1** Las placas ópticas que se utilizan para este procedimiento vienen estériles y libres de ADN de fabrica, por lo que no se requiere que se autoclaven previo a su uso.
- **7.1.2** Utilizar guantes desechables y gabacha desechable. No se debe ingresar en el área de pre amplificación (montaje de PCR y/o recorte de muestras) con una gabacha que hubiera utilizado mientras manipulaba producto amplificado en el área de electroforesis.

**Nota 3:** Las gabachas que se utilizan en la zona de pre amplificación son de diferente color a las utilizadas en la zona de electroforesis (post amplificación), esto para evitar posibles contaminaciones entre áreas. En caso UNICO de no contar con gabachas desechables se utilizaran gabachas limpias debidamente rotuladas.

- **7.1.3** Limpiar con DNA Away o similar y/o etanol de 70% la cámara estéril o de flujo laminar que se va a utilizar. Limpiar las micropipetas que se van a utilizar con DNA Away o similar y/o etanol de 70% e introducirlas a la cámara estéril o de flujo laminar. Coloque el material a utilizar (guantes, puntas, cobertores de placas, placas, tubos de PCR, gradillas y pipetas) dentro de la cámara de bioseguridad). Irradiar la cámara estéril o de flujo laminar con luz ultravioleta de 15-30 minutos.
- **7.1.4** En caso de continuar con el proceso de amplificación utilizando el pipeteador automatizado QIAgility ver anexo N.º 2, y en el caso de utilizar el pipeteador automático Hamilton ver el anexo N.º 3. Recordar que se debe irradiar con luz ultravioleta el área de trabajo y el material dentro del equipo según las instrucciones del anexo.
- **7.1.5** Limpiar la mesa de trabajo de los cubículos de montaje de PCR con DNA Away o similar y/o etanol de 70% cada vez que va a hacer un montaje.

**Nota 4:** El material usado en amplificaciones puntas, tubos de reacción y restos de muestras amplificadas deben ser desechados en recipientes de material plástico rígido (polietileno o polipropileno), impermeable y resistente a la perforación, golpes o caídas, provistos preferiblemente de un sistema que impida extraer los objetos desechados, preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra "punzocortantes" acompañada del símbolo de biopeligrosidad. Los guantes deben ser desechados en bolsas de polietileno para material bioinfeccioso.

	,	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OLI) PODER JUDICIAL	VERSIÓN 16	PAGINA: 8 de 74

- 7.1.6 Nunca lleve material amplificado a la zona de pre-amplificación como es el área de extracción de ADN o montaje de PCR (cuartos de extracción y cuartos de PCR)
- **7.1.7** Los controles que se deben montar cada vez que se realice una amplificación son:
  - Control positivo de PCR (de amplificación): aportado por el fabricante del kit (K9947, DNA Control 007, 2800M o similar).
  - Control negativo de PCR (de amplificación): es un control que lleva todos los reactivos de la amplificación excepto la muestra de ADN.
  - Control negativo de extracción: es un control que se incluye cuando se realiza la extracción de las muestras y que contiene solamente los reactivos que se usaron en dicha extracción. Cuando se realiza PCR directa, se recortará un trozo de 1,2 mm o similar de papel FTA y se coloca en el tubo correspondiente.
  - Control Positivo de extracción: se utiliza una muestra de sangre, semen o saliva que, en la medida de lo posible, ha sido tipeada previamente. Esta muestra debe pertenecer a alguna persona que no participe en los análisis.
- En caso de realizar una repetición del proceso de PCR o se realice un montaje de 7.1.7.1 otro kit de amplificación, el montaje de los controles de extracción es opcional.

Nota 5: Los criterios de aceptación para la interpretación adecuada de los controles se encuentran en el Procedimiento de Gestión de Casos e Interpretación de Resultados.

- 7.1.8 Descongelar, de ser necesario, los reactivos y de ser posible mantenerlos en hielo escarchado. Homogenizar con agitador tipo vortex o similar los reactivos una vez descongelados.
- De ser posible mantenga los reactivos en hielo escarchado. Una vez preparada la 7.1.8.1 mezcla de reacción, esta se puede mantener fuera del hielo siempre y cuando la utilice lo antes posible para ser pipeteada en los tubos de reacción o en las placas ópticas MicroAmp de 96 pozos (AppliedBiosystems).
- 7.1.9 Registrar en el Formulario "Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense" la información de referencia requerida (equipos, reactivos, entre otros)
- 7.1.10 Determinar el número de muestras que se van a amplificar. Incluya los controles de amplificación que correspondan. (Ver punto 7.1.7). Sumar una cantidad extra de reacciones a este número para compensar la pérdida de volumen por el error de pipeteo. Ese será el número total de reacciones. Este enfoque puede generar la pérdida de una pequeña cantidad de reactivos, sin embargo, asegura el contar con suficiente mezcla de reacción para todas las muestras.
- 7.1.10.1 Tome en cuenta que al utilizar el equipo QIAgility el numero de reacciones extra a considerar se aumenta aún más por el pipeteo del equipo. Considere hasta un 10% de exceso de reacciones para que el equipo funcione adecuadamente.

Nota 6: Debe indicar en el Formulario "Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense" la dilución (si aplica) y la cantidad en microlitros de ADN agregado de cada muestra a la placa o tubos de reacción.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	ст-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 9 de 74

**7.1.11**Preparar la mezcla de reacción en un tubo de microcentrífuga estéril nuevo de 1,5 mL o de 0,5 mL o de 2,0 ml, dependiendo del volumen a preparar y del equipo a utilizar, de acuerdo a las siguientes tablas, utilizando los reactivos correspondientes al kit que se encuentre utilizando:

**Nota 7:** el vol. de ADN a agregar puede ser determinado, de ser posible, según los resultados obtenidos en el proceso de cuantificación (ver Procedimiento para la Cuantificación de ADN utilizando el termociclador PCR tiempo real ABI7500) para todos los kits comerciales. Además tomar en cuenta los limites de detección y los umbrales estocástico y analítico definidos en los procesos de validación interna de cada kit comercial utilizado en la Sección.

GlobalFiler (Applied Biosystems)			
Vol. por muestra mitad de reacción (uL)	Vol. por muestra reacción completa (uL)		
Aforar a 10ul	Aforar a 25ul		
3,0	7,5		
1,0	2,5		
0,5 a 1,0 ng	0,5 a 1,0 ng		
	alFiler (Applied Biosystems) Vol. por muestra mitad de reacción (uL) Aforar a 10ul 3,0 1,0 0,5 a 1,0 ng		

GlobalFiler Express (Applied Biosystems)				
Reactivo	Vol. por muestra mitad de reacción (uL)	Vol. por muestra reacción completa (uL)		
Buffer Low TE pH 8	1,5	1,5		
Prep-N-Go (o similar)	1,5	1,5		
Master Mix**	3,0	6,0		
Primer set	3,0	6,0		
ADN	*	*		

\*Uno o más trozos de papel filtro FTA de 1,2 mm, según sea necesario ,recortados de forma manual con un micropunch o con el instrumento perforador de tarjetas FTA BSD600 ASCENT, BSD600 DUET o similar (ver anexo No. 4 y anexo No. 5).

En el tubo de reacción del control positivo de PCR se debe agregar de 1-3  $\mu L$  de Control de ADN.

\*\* antes del primer uso se deben agregar 80ul de Master Mix Additive (para el kit de 200 reacciones) o 390ul de Master Mix Additive (para el kit de 1000 reacciones).

ΡΡΟΓΕΝΙΜΙΕΝΤΟ ΡΑΡΑ Ι Α ΑΜΡΙ ΙΕΙΓΑΓΙΟΝ ΠΕ	D DCE ECT DOM 36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 10 de 74

P-DCF-ECT-BQM-36

Yfiler Plus (ADN Extraído) (Applied Biosystems)		
Reactivo	Vol. por muestra reacción completa (µL)	
BUFFER LOW TE pH 8	Aforar a 25ul	
Yfiler Plus Master Mix	10,0	
Yfiler Plus Primer Set	5,0	
ADN	0,5 a 1,0 ng**	

Yfiler Plus (Directo) (Applied Biosystems)			
Reactivo	Vol. por muestra reacción completa (µL)		
Buffer Low TE pH 8	10		
Master Mix**	10		
Primer set	5		
ADN	*		

\*Trozo de papel filtro FTA de 1,2 mm. En el tubo de reacción del control positivo de PCR se debe agregar de 1-3  $\mu$ L de Control de ADN.

	CS7 (Promega)	
Reactivo	Vol. por muestra mitad de reacción (uL)	Vol. por muestra reacción completa (uL)
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	Aforar a 10ul	Aforar a 25ul
Master Mix	2,0	5
Primer set	1,0	2,5
ADN	0,5 a 1,0 ng**	0,5 a 1,0 ng**

DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	T-BQM-36
DEDARTAMENTO DE CIENCIAS EORENSES ORGANISMO VERSIÓN 16 PAGINA: 11 de 74	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 11 de 74

## **CADENA DE LA POLIMERASA**

CS7 Directo (Promega)		
Reactivo	Vol. por muestra Mitad de reacción (µL)	Vol. por reacción completa (ul)
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	6,25	12,5
Prep-N-Go (o similar)	2,5	5
Master Mix	2,5	5
Primer set	1,25	2,5
ADN	*	*

\*Trozo de papel filtro FTA de 1,2 m. En el tubo de reacción del control positivo de PCR se debe agregar 1  $\mu$ L de Control DNA de 10 ng/ $\mu$ L.

PowerPlex Fusion Directo (Promega)		
Reactivo Vol. por muestra reacción 25µL		
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	15,0	
Master Mix	5,0	
Primer set	5,0	
ADN	*	

\*Trozo de papel filtro FTA de 1,2 m. En el tubo de reacción del control positivo de PCR se debe agregar 1  $\mu$ L de Control DNA de 10 ng/ $\mu$ L.

PowerPlex Fusion (ADN Extraído)		
Reactivo	Vol. por muestra mitad de reacción (µL)	Vol. por muestra reacción completa (µL)
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	Aforar a 10ul	Aforar a 25ul
Master Mix	2,0	5,0
Primer set	2,0	5,0
ADN	0,25 a 0,5 ng	0,25 a 0,5 ng

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 12 de 74
,		

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

Argus X-12 (Qiagen) (ADN Extraído)		
Reactiv o	Vol. por muestra mitad de reacción (μL)	Vol. por muestra reacción completa (µL)
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	Aforar a 10ul	Aforar a 25ul
Reaction Mix A	2,5	5,0
Primer Mix	1,25	2,5
MultiTaq2 DNA polymerase	0,3	0,6
ADN	0,2 a 0,5 ng	0,2 ng a 0.5ng

Investigator HDplex (Qiagen) (ADN extraído)		
Reactivo Vol. por muestra reacción 25µL		
Reaction Mix A	5,0	
Primer Mix	2,5	
MultiTaq2 DNA Polimerasa	0,4	
Agua del Kit o tipo Milli-Q o similar, estéril	Aforar a 25ul	
ADN N	0,06 a 1,0 ng	

- 7.1.12Colocar un tubo de reacción de 0,2 μL nuevo y autoclavado por cada reacción en la gradilla o bien utilice un pozo de las placas ópticas MicroAmp de 96 pozos (AppliedBiosystems) por cada reacción.
- **7.1.13**Agregar, del total de la mezcla de reacción (Master Mix) (ver el volumen correspondiente para cada kit de acuerdo a las tablas anteriores), el volumen correspondiente a cada tubo de reacción de la gradilla, y a los controles preparados en el punto 7.1.7.
- **7.1.14**Agregar la cantidad de ADN según lo que se indica en las tablas anteriores y esto de acuerdo a la concentración de la muestra que se trabaja, esto en caso de que el ADN esté extraído.
- **7.1.14.1** Para cuando se utilice algún método directo como GlobalFiler Express o Yfiler Plus directo: agregue al trozo de papel FTA de 1,2 mm o similar previamente recortado y colocado en el pocillo a utilizar, la mezcla de reacción correspondiente.
- **7.1.15**Colocar el cobertor sobre la gradilla de tubos de 0,2ul o la placa de reacción de 96 pocillos e identifique el soporte.
- **7.1.16**Limpiar utilizando papel toalla desechable y absorbente las mesas de trabajo, cámaras de flujo laminar, cabina estéril, micropipeteadores y todas las áreas donde se trabaja

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	т-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 13 de 74

con ADN con DNA Away o similar y/o etanol de 70% y dejar irradiando con luz UV por al menos 15min tanto la cámara de flujo utilizada como el equipo de pipeteo QIAgility, tal y como se indica en el Anexo 2.

### 7.2 AMPLIFICACIÓN

**7.2.1** Colocar la gradilla en el termociclador, cerrar la cubierta y seleccionar el programa correspondiente al kit que se está utilizando. Iniciar el termociclador de acuerdo a los programas que se nombran a continuación.

**Nota 8**: Para el manejo de los termocicladores ver Procedimiento para el uso y manejo del Termociclador Veriti y/o Procedimiento para el uso y manejo del Termociclador ProFlex.

Global Filer	
Método	Ciclos
Hold	1
Ciclos	29
Hold	1
Hold	Hasta 24hrs
	Global Filer <u>Método</u> Hold Ciclos Hold Hold

# PROGRAMAS DE TERMOCICLADO

Global Filer Express			
Temperatura/tiempo	Método	<u>Ciclos</u>	
95ºC/1 min	Hold	1	
94°C/3 s 60°C/30 s	Ciclos	26	
60°C/8 min	Hold	1	
4°C	Hold	Hasta 24hrs	

Y Filer Plus			
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos	
95°C/1 min	Hold	1	
94°C/4	Ciclos	20	
S	Cicios	50	
61,5°C/			
1 min			
60°C/22	Hold	1	
min			
4°C	Hold	Infinito	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 14 de 74
--	------------	------------------

### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

Y Filer Plus Directo			
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos	
95ºC/1 min	Hold	1	
94°C/4 s 61,5°C /1 min	Ciclos	29	
60°C/22 min	Hold	1	
4°C	Hold	Infinito	

	CS7	
Temperatura/tiempo	<u>Método</u>	<u>Ciclos</u>
96ºC/2 min	Hold	1
(Ramp 100%) 94ºC/30 s		
(Ramp 29%) 60ºC/30 s	Ciclos	10
(Ramp 23%) 72ºC/45 s		
(Ramp 100%) 90ºC/30 s		
(Ramp 29%) 60°C/30 s	Ciclos	20
(Ramp 23%) 70°C/45 s		
60°C/30 min	Hold	1
4°C	Hold	Infinito

CS7 Directo			
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos	
96ºC/2 min	Hold	1	
(Ramp 100%) 94ºC/30 s			
(Ramp 29%) 60°C/30 s	Ciclos	10	
(Ramp 23%) 72ºC/45 s			
(Ramp 100%) 90°C/30 s			
(Ramp 29%) 60°C/30 s	Ciclos	18	
(Ramp 23%) 70ºC/45 s			
60ºC/30 min	Hold	1	
4°C	Hold	Infinito	

DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSION 10	PAGINA: 15 de 74
MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	CT-BQM-36

PowerPlex Fusion Directo				
Temperatura/tiempo	Método	<u>Ciclos</u>		
96°C/1 min	Hold	1		
94°C/10 s				
59°C/1 min	Ciclos	27		
72°C/30 s				
60°C/20 min	Hold	1		
4°C	Hold	Infinito		
		~~		
	Nuer Diev Fusien ADN	$-\bigcirc$		
	Extraído			
Temperatura/	<u>Método</u>	<u>Ciclos</u>		
tiempo	$\cap$			
96°C/1 min	Hold	1		
94°C/10 s				
59°C/1	Ciclos	30		
min 72°C/				
30 s				
60°C/10 min	Hold	1		
4ºC	Hold	Infinito		
	Argus X-12			
Temperatura/tiempo	<u>Método</u>	<u>Ciclos</u>		
94ºC/4 min	Hold	1		
96ºC/30 s				
63ºC/120 s	Ciclos	5		
72°C/75 s				
94°C/30 s				
60°C/120 s	Ciclos	25		
72°C/75 s				
68ºC/60 min	Hold	1		
10°C	Hold	Infinito		

Investigator HDplex			
Temperatura/	<u>Método</u>	<u>Ciclos</u>	
tiempo			
94ºC/4 min	Hold	1	
94ºC/30 s			
60°C/120 s	Ciclos	30	
72ºC/75 s			
68ºC/60 min	Hold	1	
10°C	Hold	Infinito	

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 16 de 74

- **7.2.2** Luego de la amplificación puede continuar con la fase de electroforesis capilar (ver Procedimiento de uso y manejo del Analizador Genetico ABI3500). De lo contrario puede guardar la gradilla a -20°C aproximadamente (congelación) hasta que se realice la electroforesis capilar. Almacene solamente en área de post-amplificación.
- **7.2.3** Las muestras junto con los controles positivo y negativo, ya están listas para llevar a cabo la fase de electroforesis capilar (Ver: Procedimiento para el uso y manejo del Analizador Genético ABI3500)

### 8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

- **8.1** Los controles positivos y negativos deben cumplir con lo estipulado en el Procedimiento de Gestión de Casos e Interpretación de resultados, Sección de Genética Forense.
- **8.2** Todas las micropipetas definidas como equipos críticos que se utilicen en la procedimiento de amplificación de marcadores genéticos deben estar debidamente calibradas y verificadas y deben cumplir con lo estipulado en el Procedimiento Gestión de Casos e Interpretación de Resultados.
- **8.3** Todos los equipos de pipeteo automático tipo Qiagility o similar que se utilicen en el procedimiento de amplificación de marcadores genéticos deben estar debidamente calibrados y verificados y deben cumplir lo estipulado en el Procedimiento Gestión de casos e interpretación de resultados.
- **8.4** Acciones Correctivas:
- **8.4.1** De encontrarse algún reactivo contaminado se debe eliminar inmediatamente e informar al resto del personal para que tome las precauciones necesarias. Se deberá proceder según PON Control de Trabajo No Conforme, Acciones Correctivas, Acciones Preventivas y Mejoras.
- **8.4.2** En caso de encontrar que la temperatura del congelador y/o refrigerador no es la esperada, o se detecte alguna falla, reporte al Jefe de Sección y/o al Líder Técnico y/o a la persona que la Jefatura de Sección defina previamente mediante correo electrónico. Coordine el traslado de reactivos o extractos a otros refrigeradores o congeladores en caso de que estos presenten alguna falla. Informe a todas las personas que tienen reactivos en ese refrigerador y/o congelador para que los trasladen.

### 9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

### **10** Reporte de Análisis y Resultados:

- **10.1** En caso de utilizar el pipeteador automático Qiagility se deberá salvar el post run report colocando la siguiente información: <u>Fecha-#Qiaglity-Kit amplificacion-Usuario</u> y se deberá agregar al legajo digital de los casos.
- 10.1.1Si el uso del pipeteador solamente es para dispensar un volumen especifico y no requiere rotulación de muestras, no es necesario agregar el post run report al legajo digital, solamente se debe indicar el uso el equipo en el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post-Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 17 de 74
<b>ΟΡΟΛΕΝΤΜΙΕΝΤΟ ΒΑΡΑ Ι Α ΑΜΡΙ ΤΕΤΛΑΓΤΌΝ ΝΕ</b>		

P-DCF-ECT-BQM-36

- **10.2** En caso de utilizar el pipeteador automático Hamilton se deberá salvar el post run report colocando la siguiente información: <u>Normalizacion- LV-PCR Fecha Kit</u> y se deberá agregar al legajo digital de los casos.
- 10.2.1Si el uso del pipeteador solamente es para dispensar un volumen especifico y no requiere rotulación de muestras, no es necesario agregar el post run report al legajo digital, solamente se debe indicar el uso el equipo en el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Amplificación y Post-Amplificación de Marcadores Genéticos por PCR: Sección de Genética Forense
- **10.3** Se debe realizar el reporte de resultados y la interpretación de los mismos de acuerdo a lo estipulado en el SADCF.

## **11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:**

- Recuerde colocarse la gabacha y los guantes antes de manipular las muestras, ya que los fluidos biológicos son fuente potencial de enfermedades por lo tanto debe manipularse según normas establecidas.
- No ingrese en el área de montaje de PCR con gabacha o guantes que tuviera colocados, mientras manipulaba producto amplificado en la zona de post amplificación. (área de electroforesis)
- El montaje de PCR se debe hacer en cabina estéril o de flujo laminar previamente limpiada con DNA Away o similar y/o etanol de 70% e irradiada con luz ultravioleta de 15 a 30 minutos. En caso de utilizar los equipos de pipeteo automático tipo QIAgility o similar, estos deberán haber sido irradiados previamente, al menos 15 minutos con luz ultravioleta.
- Revise que estén preparados todos los reactivos que se necesitan y que estos cumplan las normas mínimas de calidad (botellas bien cerradas, que los reactivos hayan sido almacenados como corresponda a cada uno, disoluciones sin turbiedad, rotulados adecuadamente).
- Mantenga los reactivos para PCR bien cerrados mientras se está preparando el montaje.
- El kit de amplificación debe ser guardado aparte del material amplificado y, si es necesario alicuotar, se debe realizar en cámara de flujo laminar o en cámara de montaje de PCR.
- El material usado en amplificaciones (puntas, tubos de reacción), restos de muestras amplificadas, extractos y los guantes deben ser desechados en basureros para material bioinfeccioso, rotulados para tal fin.
- Evite tocar el plato calentador del termociclador mientras está funcionando ya que la temperatura del mismo es alta.
- Mantenga los reactivos de PCR a la temperatura indicada por el fabricante (alrededor de -20°C los kits de Promega y de 2°C a 8°C los kits de Applied Biosystems).

## 12 Simbología:

• ADN: Ácido Desoxirribonucleico

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 18 de 74

- BQM: Bioquímica
- CS7: PowerPlex CS7 System
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses

**CADENA DE LA POLIMERASA** 

- EDTA: Ácido etiliendiaminotetraacético
- FTA: Tarjetas para recolectar y almacenar ácido nucleico, semejantes a "FTA Cards", Whatman
- g: gramos
- min: minutos
- mL: mililitros
- MM: Mezcla de reacción, siglas en inglés Master Mix
- ng: nanogramos
- N/A: No Aplica
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PON: Procedimiento de Operación Normado
- s: segundos
- SCD: Solicitud de Cambio Documental
- SGC: Sistema de Gestión de la Calidad
- vol: Volumen
- °C: Grados Celsius, unidad de medida de temperatura
- uL: microlitros

### 13 Terminología:

N/A

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos
02	Guía de uso de equipo QIAgility (Normalización de muestras)
03	Guía de uso de equipo Hamilton Nimbus (Normalización de muestras)
04	Guía de uso del Perforador de tarjetas de papel filtro BSD600-ASCENT
05	Guía de uso del Perforador de tarjetas de papel filtro BSD600- DUET

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 19 de 74
DDOCEDIMIENTO DADA LA AMPLITEICACIÓN DE		

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACION DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

#### Anexo No. 1

### Preparación de reactivos

#### Detergente Terg-A-Zyme al 1 %

Disuelva 10,00 g de Detergente Terg-A-Zyme en 1 Litro de agua de tubo.

Preparar en el momento del lavado del material, no almacenar y consumir en su totalidad durante el lavado.

### EDTA 0,5 M pH 8

Pese 186,10 g EDTA disódico utilizando una balanza, coloque en un beaker de 1,0 L y agregue 800 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril, ajuste el pH 8 (utilice pH-metro) con perlas de NAOH, luego afore a 1 L con agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril en un balón aforado, trasvase a botella de vidrio trasparente y autoclave.

Almacene a temperatura ambiente y hasta que la solución no presente turbidez.

#### Etanol al 70%

Agregue a una probeta de 1 Litro, 737 mL de alcohol al 95% y lleve a un Litro con agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril. Rellene en las pizetas de 500 mL rotuladas como etanol al 70%.

### Tris HCl 1M pH8

Pese en una balanza 121.8g de Tris Base y disuelva con 800mL de agua tipo Milli Q, ajustando el pH a 8 con HCl concentrado. Utilice el pHmetro para medir el ajuste.

Afore con agua tipo Milli Q en balón aforado de 1L.

Autoclave la solución en botella de vidrio transparente y almacene a temperatura ambiente por un año, revise periódicamente que la solución o presente turbidez.

### Low TE Buffer

Agregue 10 ml de Tris HCl 1M pH8, 0.2 ml de EDTA 0,5 M pH 8 y lleve a 1 Litro en balón aforado con agua tipo Milli Q.

Autoclave la solución en botella de vidrio transparente y almacene a temperatura ambiente por un año, revise periódicamente que la solución no presente turbidez.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 20 de 74
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIEICACIÓN DE		T DOM 26

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACION DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

P-DCF-ECT-BQM-36

### Anexo No. 2

### **GUÍA DE USO DE PLANTILLAS NORMALIZACIÓN DEL QIAGILITY**

Elaborado por: Manuel González Cordero

Revisado por: Magaly Segura Castillo

Junio 2021

### Preparación de muestras y datos

Al recibir el reporte de cuantificación, abra el archivo de Excel (Calc Spreadsheet de Libre Office) que se adjunta. En una hoja nuevo de ese mismo documento o en un documento nuevo copie los datos de cuantificación de las muestras con su respectivo nombre. Haga esto de tal manera que los nombres queden en la columna A y los datos de cuantificación en la B. Estos datos se pueden exportar al QIAgility, ahorrándose de esta manera la digitación.

Los datos de cuantificación se deben de dividir en 4 grupos distintos para montaje del kit Globalfiler:

- < 0.1 ng/uL (determinar cuáles muestras tienen cuantificación para poder llegar a la cantidad mínima de ng para amplificar un perfil o se declaran como insuficientes, en cuyo caso no se deben de incluir en la lista)
- 2. 0.1 1.3 ng/uL
- 3. 1.4 5.3 ng/uL
- 4. 5.4 10.6 ng/uL

Muestras con concentración mayor a 10.6ng/uL deben de diluirse MANUALMENTE para que entren en alguna de las categorías anteriores.

Los datos de cuantificación se deben de dividir en 6 grupos distintos para montaje del kit Fusion:

- 1 < 0.035 ng/uL (determinar cuáles muestras tienen cuantificación para poder llegar a la cantidad mínima de ng para amplificar un perfil o se declaran como insuficientes, en cuyo caso no se deben de incluir en la lista)
- 2 0.035 0.1 ng/uL
- 3 0.1 0.3 ng/uL
- 4 0.3 0.5 ng/uL
- 5 0.5 0.7 ng/uL
- 6 0.7 1 ng/uL

Muestras con concentración mayor a 1ng/uL deben de diluirse MANUALMENTE para que entren en alguna de las categorías anteriores.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 21 de 74

Para ordenar los datos en la hoja del Calc Spreadsheet una vez realizada la lista solicitada anteriormente, seleccione las muestras con el mouse, en la barra superior haga click en Data y luego en Sort. En la pantalla que se despliega seleccione Columna B y orden Ascending. Esto ordenará la lista de muestras por cuantificación de menor a mayor, haciendo más fácil la división de los datos según los grupos especificados arriba



En este ejemplo las muestras de la fila 2-4 caen dentro de la categoría < 0.1ng/uL (3 muestras), por lo que el equipo pondrá siempre 15uL de la misma en la placa de reacción. En este caso, la concentración máxima de una muestra sería de 0.09ng/uL, si se agarran 15uL se tendrían: 0.09ng/uL x 15uL= 1.35ng de ADN para amplificar, sin embargo, el volumen final de reacción es de 25uL (muestra + Master Mix), por lo que la dilución de ADN presente será de 1.35ng / 25uL= 0.054ng/uL, que es la concentración ideal de amplificación.

Las muestras de la fila 5-12 (8 muestras) caen dentro de la categoría 0.1 - 1.3 ng/uL, las de la fila 13-17 (5 muestras) dentro de la categoría 1.4 - 5.3 ng/uL y la muestra 18 en la categoría 5.4 - 10.6 ng/uL. Todas estas muestras serán AUTOMATICAMENTE diluidas a una concentración de 0.053ng/uL por el equipo y luego se pondrán 15uL de la dilución en el tubo de reacción, para de esta manera tener un total de 0.053ng/uL x 15uL= 0.8ng de ADN a amplificar.

Una vez ordenados los datos de las cuantificaciones, se debe de guardar la hoja como un archivo .csv, el cuál se importará a la plantilla del QIAgility. Para esto, haga click en "File" de las pestañas superiores, luego en "Save As". Seleccione la dirección en que quiere guardar el archivo y luego haga click en "Save as type", de la lista que se despliega seleccione "Text CSV". Aparece una advertencia "Confirm File Format" a la que hay que seleccionarle "Use Text CSV Format". Luego aparece otro diálogo "Export Text File" al que se le da "Ok". Por último sale una advertencia de que solamente se guarda la hoja del Calc Spreadsheet en uso, se hace click en "Ok".

DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO	VERSIÓN 16	PAGINA: 22 de 74

MGC + PRACTICA REAL OIA + quant	✓ 4+ Search quant	2 ⋅ 3			Confirm File Format		× -
Organize ▼ New folder		0 21 - E	• •		This document may be saved in the curre	contain formatting or con ently selected file format *	tent that cannot 'Text CSV''.
Favorites Anne Date	modified Type Size		1		Use the default ODF file	format to be sure that the docu	ment is saved correctly.
Desktop	/2021 1:14 PM Microsoft Excel 97	41 KB			Ask when not saving in	n ODF or default format	
Je Downloads						here there could a made	Use ODE Farmet
Sk Recent Places						gse text CSV Format	Ose ODF Format
📜 Libraries							
3 Documents							
🕹 Music							
S Pictures							
J Videos							
		_					
Homegroup • •		•					
200421 FEC TRIO LOT2005085 ave 010122 data							× )
File name: 500421_EEC_TRID E012000065exp010122_data		•			Export Text File		
Save as type: Excel 97-2003		-			Export Text File		
Save as type: Excel 97-2003 ODF Spreadsheet					Export Text File Field Options	5 015 L 1050 M	
File name: 300-21_EBC_INKC012000005000000000000000000000000000000					Export Text File Field Options Character set: Western	Europe (Windows-1252/Win	Latin 1)
nie name: 304421_EC; Into 101200605585p010122_0648 Save as type: Bixel 97-2003 ODF Spreadcheet ODF Spreadcheet ODF Spreadcheet Unified Office Format spreadcheet Unified Office Format spreadcheet				7	Export Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: ,	Europe (Windows-1252/Win	Latin 1)
rite name: 30442_EC; 1101/00120086390p00022_0444 Save at type: DOFS preaddheet ODFS preaddheet Template Fait XML ODFS preaddheet Unified OTHce Format spreadsheet Unified OTHce Format spreadsheet Excret 2007-355 template				V	Export Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: , String delimiter: "	Europe (Windows-1252/Win	Latin 1) V
rite hame: 304-21_EC, 1101 CU 200605250000022,0444 Save as type: [Save 397-2003 ODF Spreadsheet ODF Spreadsheet ODF Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Excel 2007-365 Excel				. 6	Export Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: , String delimiter: " 2 Save cell content as show	Europe (Windows-1252/Win	
rite tame: 30x42_EC; 110/10/20080398/p0/01/22_044a Save as type: Cover 97-2003 ODF Spreaddheet Template Flat XML ODF Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Excel 2007-365 template Excel 2007-365 template Excel 97-2003 Excel 97-2003 Excel 97-2003				5	Eport Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: , String delimiter: " Save cell content as show Save cell formulas instea	Europe (Windows-1252/Win wn ut of calculated values	
rite tame: 304/21/26/2, 110/10/00/80/90/00/22/2048 Save as type: Conf Syrandinet ODF Syrandinet ODF Syrandinet Flat 3ML ODF Synadihet Unified Office Format spreadsheet Excel 2007-365 Excel 2007 Excel 2007 Excel 2007					Eront Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: String delimiter: Save cell content as show Save cell content as instea Oute all text cells	Europe (Windows-1252/Win wn id of calculated values	(atin 1) •
The familie: 30442_EEC, 1NU EOT 20085387000022_0418 Save as type: Encel 97-2003 ODF Spreadsheet ODF Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Excel 2007-365 Excel 2007 Excel 2007 Excel 2007 Excel 2007 Excel 2007 Excel 2007					Field Options Field Options Character set: Western Field delimiter: , String delimiter: , Save cell content as ghov Save cell formulas instea Quote all text cells Field column width	Europe (Windows-1252/Win wn d of calculated values	Latin 1) V
rite name: 30442_EEC, 1NJ 1017206835890001222,0448 Save as type: DPS George 97-2003 OPS Spreadsheet Template Fata XML 00PS Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Exect 2007-365 template Exect 97-2003 Template Data Interchange Format dBASE Hilde Folders SVLK				OV.P	Evoci Text File Field Options Character set: Western Field delimiter: String delimiter: Save cell content as ghov Save cell formulas instea Quote all text cells Fixed column width	Europe (Windows-1252/Win wn d of calculated values	Latin 1) V
Hite Finance: 30042_LEC, IND CO1200685450000022_0848 Save as type: Conf 5preadsheet ODF Spreadsheet ODF Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Exerce 2007-355 Exerce 2007-35 Exerce 2007-355 Exerce 2007-355 Exerce 2007-35 Exerce 2007-355 Exerce 200			0	01/	Erport (ex File Field Options Durardir set: Visition Field delimiter: String delimiter: Save cell content as ghov Save cell formulas indea ucute all toxic cells Fived column gidth Help	Europe (Windows-1252/Win wn d of calculated values	(atin 1) •
rite hame: 30442_EEC, 1NJ 00120083/sep000122_041a Save as type: 0045_EEC, 1NJ 00120083/sep000122_041a ODF Spreadsheet Template Flat XML 005 Spreadsheet Unified Office Format spreadsheet Excel 207-355 template Excel 97-2033 template Excel 97-2033 template Data InterChange Format dataSi Hitle Folders  Stat Size (State Contemplate Data InterChange Format dataSiz Hitle Colders  Size (State Contemplate Data InterChange Format dataSiz Hitle Colders  Size (State Contemplate Data InterChange Format dataSiz Hitle Colders  Size (State Contemplate Data InterChange Format dataSiz Hitle Colders  Size (State Contemplate Data InterChange Format dataSiz Hitle Colders  Size (State Contemplate DataSize (State C			,0	01	Erport (se File Field Options Character set: Westorn Pield delimiter: String delimiter: Save cell content as gho Save cell content as gho Save cell content as gho Save cell content as gho Save cell content as gho Fixed column width Help	Europe (Windows-1252/Win wn d of calculated values	Latin 1) •
Tele hame: 300422_EEX, 1N01C0120068/SEpUGU22_Qala Save as type: [See 97-2003 ODF Spreadsheet Template Fait XML ODF Spreadsheet Lond ODF Spreadsheet Excel 2007-365 Template Excel 2007-365 Template Data Interchange Format Hide Folders Vik FolderSourcent (Cak) Vik FolderSource (Cak) FolderSource (Cak			<i>.e</i>	01	Erport for File Field Options Character set: Westom Field delimiter: String delimiter: Save cell content as phon- Save cell formdas instee Quote all lott cells Fixed column width Help	Europe (Windows-1252/Win vm d of calculated values	Latin 1) •

## Uso de las plantillas de Normalización

Busque en el escritorio de la laptop la carpeta de las plantillas de montaje. Seleccione para Globalfiler la plantilla "Plantilla GF Normalización+PCR (RC) (10.6 ng por uL)" y haga doble click para entrar al programa del QIAgility (en el caso del kit Fusion la plantilla es "Plantilla FSN Normalización + PCR (RC) (1ng por ul)").

Esta plantilla está diseñada de la siguiente manera

GUIA Plantilla GF Norm	alizacion + PCR (RC)_(	10.6ng por ul)	QAS - QU	igility (	IRTUAL	MODE	- [Samp	ies)						-											- 0 - X
File Control Wizard	S Options Help		2			-	*			*															- 0
		A1: Tip (200	d Conduct	ive tip. C	AGEN	Ę,		ų	н ч		A2: Sample	(1.5ml tape	red hinger	tube, QLA	GEN)	•	,		-	Sample Diluen Bank M	e Banks (se Muestras co	elect a sample bank t	o highlight thos	ie samples)	
		•	00000	00000	00000	•	::				4		0	0	0	0	0	0	5	Bank P Bank P Bank P Bank P Bank P	Muestras co Muestras Di Muestras Di Muestras Di Muestras Di	on Cn entre 1.4 y 5.3n on Cn menores a 0.1n iluidas Cn entre 1.4 y on Ch 5.4 y 10.6 ng/ul. iluidas Cn entre 5.4 y	g/ul. 0 well(s) g/ul. 0 well(s) 5.3 ng/ul. 0 well 0 well(s) 10.6 ng/ul. 0 we	l(s) ell(s)	
M1 (Mix plate (5 tube por ^ 1	*	:		00000							• (		0	0	0	0	0	0		Dele	ne Bank	Bename Bank	New Bank	Edit B	lank
ų ⊂ į	* () . tau	81: Tip (50)	Conductiv	re tip, Qt	AGEN)						82 Reacti	on (1.5ml tag	sered tube	Generic)						Plate IC		32 Well Pap Cep press	Samples mu they can be i are greyed o	c] st be part of used. Sampl sut.	a group before les not in group
R1 (Reagent block (stan	lard 200,1123	:	0 0	•			::	:			ċ		Ó	Ô	Ò	Ó	Ò	Ò		Well Di	Impor isplay Orde	r C Label:	<u>Clear</u> Sequence	(  Pipeti	sample bank
~© <b>2</b>	•	•		::	:	•	::	:			p (		0	0	0	0	0	0		Well	Mell	Sample Name Sample A1 @ A2	Samp	/e ID	0 -
~© +© *©	· 🔘	•	0 0 0	::	::		::	:			, (		0	0	0	0	0	0		•	C1 D1	Sample D1 @ A2 Sample D1 @ A2			0
*0 °O *0	·•	C1: Bearting	1200w1 PC	B tube	811						• (		0	0	0	0	0	0		•	A2 B2 C2	Sample A2 @ A2 Sample B2 @ A2 Sample C2 @ A2			0
*O *O	-0	7	• •	, . o o	0 0	, , ,	• •	•	" " 0		• (		0	0	0	0	0	0		0	D2 A3	Sample D2 @ A2 Sample A3 @ A2			0
••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	·O		• •	0 0 0	0 0 0 0	000	0000	000	000		• (		0	0	0	0	0	0		•	C3 D3	Sample B3 @ A2 Sample C3 @ A2 Sample D3 @ A2			0
*0 ·0	•		0000	00000	0000	0000	00000	0000	0000		. (		0	0	0	0	0	0		0	A4 B4 C4	Sample A4 @ A2 Sample B4 @ A2 Sample C4 @ A2			0 0 0 0
	- Um																			•	D4 A5	Sample D4 @ A2 Sample A5 @ A2			0

COSTA RICA		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO	VERSIÓN 16	PAGINA: 23 de 74

1:Block del Diluyente. Aquí se coloca el diluyente de muestras (Buffer TE) en la posición celeste

2: Block de Reactivos. Aquí se coloca el Master Mix PREPARADO MANUALMENTE en la posición narania.

3: Gradilla de puntas de 200uL arriba y de 50uL abajo.

4: Bloque para muestras a DILUIR en Eppendorf.

5: Bancos de muestras: se definen las muestras de acuerdo a cada subgrupo de cuantificación.

6: Bloque para muestras del primer grupo <0.1ng/uL y para TUBOS VACÍOS de muestras por diluir.

NO CONTR 7: Placa de 96 muestras para llevar a PCR

8: Datos de muestras en uso

Antes de comenzar a editar la plantilla sálvela con el nombre de la corrida que se va a realizar: en la barra superior haga click en "File", luego en "Save As...". Escoja la dirección en donde va a guardar esta corrida y de click en "Save" en la esquina inferior derecha del dialogo que se había abierto

### Edición de los bancos de muestras

### Muestras con concentración menor a 0.1ng/uL

Para comenzar, haga click en el block de muestras a diluir (4). Al hacer esto se activa el recuadro de bancos de muestras (5). Marque la opción "Bank Muestras con CN menores a 0.1ng/ul". Esto despliega un diálogo en dónde se hace un zoom, en este caso particular, al bloque de muestras 6. Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de ese grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían TRES pocillos. Se debe de seguir el orden de llenar primero la columna: A1, A2, etc. Una vez seleccionadas se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque 6 y en el 7 (placa de 96) que hay 3 pocillos con color.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 24 de 74



Muestras con concentración entre 0.1-1.3ng/uL

CADENA DE LA POLIMERASA

Para comenzar, haga click en el block de muestras por diluir <u>4</u>. Al hacer esto se activa el recuadro de bancos de muestras (<u>5</u>). Marque la opción "Bank Muestras con Cn 0.1-1.3ng/ul". Esto despliega un diálogo en dónde se hace un zoom al bloque <u>4</u>: Bloque para muestras a DILUIR en Eppendorf.

Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de ese grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían OCHO pocillos. Una vez seleccionadas se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque  $\underline{4}$  y en el  $\underline{6}$  que hay 8 pocillos con color.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	T-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 25 de 74

CADENA DE LA POLIMERASA



Se debe de tomar en cuenta de que el equipo NO NECESARIAMENTE coloca las muestras en el bloque  $\underline{6}$  en orden, por lo que una vez que se ha hecho lo anteriormente descrito, se debe de:

Hacer click en el recuadro de 5 de Bancos de muestras y ahí seleccionar la opción "Bank Muestras <u>Diluidas</u> Cn 0.1-1.3ng/ul". Esto despliega el diálogo en dónde se hace un zoom al bloque de muestras <u>6</u>: pantalla "Update Sample Bank". Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de este grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían OCHO pocillos.

Tomar en cuenta que ya van a aparecer las muestras del primer grupo de cuantificaciones (<0.1ng/uL), por lo que se deben de seleccionar los pozos inmediatamente disponibles o si se desea se puede pasar a la columna siguiente y seleccionar cuantos pocillos sean necesarios. TOME EN CUENTA QUE EN LAS POSICIONES SELECCIONADAS ES EN DONDE EL EQUIPO HARÁ DILUCIONES Y SE DEBE DE COLOCAR UN EPPENDORF NUEVO. La selección hecha se ve reflejada en "List of Wells" al centro de la pantalla

Una vez seleccionados los pocillos se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque 6 y en el 7 (placa de 96) que hay, en este caso, OCHO pocillos más con color.

C	OSTA RIČA			
PROCEDIMIENTO P MARCADORES GENÉ CADENA D	ARA LA AMPLIFICACIO TICOS POR LA REACCI DE LA POLIMERASA	P-DCF-E	CT-BQM-36	
22         Secure (1) Stat tapened hades (MAGCN)	Sergeb Back (solide a sample look to highlight tures earples)           Difference           Back Matches can Ch S1 + 13 Mpd Evel(S)           Back Matches can Ch S1 + 13 Mpd Evel(S)           Back Matches can Ch S1 + 13 Mpd Evel(S)           Back Matches can Ch S1 + 13 Mpd Evel(S)           Back Matches Charles C + 14 K S1 Mpd Evel(S)           Back Matches Charles C + 14 K S1 Mpd Evel(S)           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))           Back Matches C + 445 K S1 (H S Mpd Evel(S))	Tip (2004) Conductive Ng. Utildes Complete C	25 savelet 1 anarole Bark sh Name Bark	bit Hapend Have, UNCERN
21: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)       22: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)         31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)       31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)         31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)       31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)         31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)       31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)         31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)       31: Tig (PM)d Conductive to, QM/dEN)         4: O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	It Instrumentation       instrumentation         It Instrumentation       instrumentation <td< td=""><td>• 0 0 • 0 •</td><td></td><td></td></td<>	• 0 0 • 0 •		

Seguidamente, haga clic en el bloque de muestras 6, esto cambia al recuadro de bancos de muestra (5) por el recuadro de "Reaction list" o lista de reacción. Seleccione "Normalize samples of Muestras con Cn 0.1-1.3ng/uL to conc 0.053 in 2x32well" para corroborar el pocillo de inicio de la normalización para ese grupo:

2 Sar	nole (1.5	imi tanere	d hinaed	tube. QIA	GENI					Reaction List
	1		3	•	5	•	7	•		Normalia services of Muestras con Chief angle to conclude a service of the service of the service of Muestras con Chief 1.4 y 5.3 ng/ul to conc 0.053 in 2 2 2 Normalia services of Muestras con Chief 4.4 10 Regulation concervices 0.053 in 2
^	$\odot$		Pripette 15 Un of Muestras con Cri oren a 0.1 ng/ul + Master/Mix to 96 well pi Pripette 15 Un of Muestras con Cri menores a 0.1 ng/ul + Master/Mix to 96 well piette Pripette 15 ul of Muestras Diluidas Cri 0.1 -1 3ng/ul + Master/Mix to 96 well piette							
•	$\bigcirc$		Pipette 19 ul of Muestras Diluidas Cn entre 1.4 y 5.3 ng/ul + MasterMix to 96 w Ripette 16 ul of Muestras Diluidas Cn entre 5.4 y 10.6 ng/ul + MasterMix to 96							
۰	$^{\circ}$	$^{\circ}$	$\odot$	$^{\circ}$	$\bigcirc$	$^{\circ}$	$^{\circ}$	$^{\circ}$		Pipette MasterMix to 96 well plate (vertical) @ C1. (4 wells) Turning HEPA Air Filter off
٥	$^{\circ}$	$^{\circ}$	0	$^{\circ}$	$^{\circ}$	$^{\circ}$	$\circ$	$^{\circ}$		
										Add Edit Copy Delete Retarget ?
2: Re	action (1	.5ml tape	red tube,	Generic)		,			!	Special Select All
1	0	0	0	0	$\bigcirc$	$\odot$	$\odot$	$\bigcirc$		Reaction Data Selected Plate: 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2
	$\bigcirc$		Plate ID							
	$\sim$	$\sim$	$\bigcirc$	$\sim$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$		Import Export Clear
3	$\bigcirc$		Well Display Order C Label @ Pipetting Sequence							

Sample Normalizati	ion	<b>X</b>
This tool performs samp	ple-by-sample normalization into a reaction plate.	QK
Select the sample ban	nk and the diluent	<u>C</u> ancel
Diluent:	Diluent	
Sample bank:	Muestras con Cn 0.1-1.3ng/ul, 0 well(s)	
Select the reaction pla	ate to dilute into:	
2x32 well Flip Cap plat	te (vertical, lettered columns) @ B2 First well: B6	
Select the dilution para	ameters to use: A5	
Final volume:	50µiA8	
Desired concentration	Lowest non-zero sample B1	
Mix count:	2 A V	
Pipette product to a se	econdary plate?	
Use secondary tar	get?	
<no selection=""></no>	First well:	
Secondary volume:		
Mix count	5	
Advanced options		
Allow contaminatio	n (uses less tips, contaminates sample with diluent)	
Preserve source w	vell indices?	
NOTES:		
	Ŧ	

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	т-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 27 de 74

Se despliega el diálogo "Sample normalization". Aquí se debe de modificar la opción "First well" de tal manera que se seleccione el PRIMER POCILLO de la selección hecha anteriormente en "Update Sample Bank" para que el equipo sepa cuál es el primer pocillo en donde debe de hacer la normalización solicitadada. En el caso del ejemplo en cuestión sería A4. Se hace click en "Ok".

### Muestras con concentración entre 1.4-5.3ng/uL

Para comenzar, haga click en el block de muestras por diluir <u>4.</u> Al hacer esto se activa el recuadro de bancos de muestras (<u>5</u>). Marque la opción "Bank Muestras con Cn 1.4 y 5.3ng/ul". Esto despliega un diálogo en dónde se hace un zoom al bloque <u>4</u>: Bloque para muestras a DILUIR en Eppendorf.

Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de ese grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían CINCO pocillos. Una vez seleccionadas se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque <u>4</u> y en el <u>6</u> que hay 5 pocillos con color.



Se debe de tomar en cuenta de que el equipo NO NECESARIAMENTE coloca las muestras en el bloque <u>6</u> en orden, por lo que una vez que se ha hecho lo anteriormente descrito, se debe de:

Hacer click en el recuadro de <u>5</u> de Bancos de muestras y ahí seleccionar la opción "Bank Muestras <u>Diluidas</u> Cn entre 1.4 y 5.3 ng/ul". Esto despliega el diálogo en dónde se hace un zoom al bloque de muestras <u>6</u>. Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de este grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían CINCO pocillos.

Tomar en cuenta que ya van a aparecer las muestras del primer grupo de cuantificaciones (<0.1ng/uL) así como las del segundo grupo de 0.1-1.3ng/uL, por lo que se deben de seleccionar los pozos inmediatamente disponibles o si se desea se puede pasar a la columna

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	ст-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 28 de 74

siguiente y seleccionar cuantos pocillos sean necesarios. TOME EN CUENTA QUE EN LAS POSICIONES SELECCIONADAS ES EN DONDE EL EQUIPO HARÁ DILUCIONES Y SE DEBE DE COLOCAR UN EPPENDORF NUEVO. La selección hecha se ve reflejada en "List of Wells" al centro de la pantalla.

Una vez seleccionados los pocillos se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque 6 y en el 7 (placa de 96) que hay, en este caso, OCHO pocillos más con color



Seguidamente, haga clic en el bloque de muestras 6, esto cambia al recuadro de bancos de muestra (5) por el recuadro de "Reaction list" o lista de reacción. Seleccione "Normalize samples of Muestras con Cn entre 1.4 y 5.3ng/uL to conc 0.053 in 2x32well" para corroborar el pocillo de inicio de la normalización para ese grupo:

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 29 de 74

								1 to do to 1 do to 1	see surple restriction
nple (1.5m	ni tapere	d hinged	ube, QIA	GEN)				Normalize samples of Muestras con Cn 0.1-1.3ng/ul to conc 0.053 in 2x32 well	This tool performs sample-by-sample normalization into a reaction plate.
		,	·			,		323 Normalize samples of Muestras con Cn entre 1.4 y 5 3ng/ul to conc 0.053 in 2 323 Normalize samples of Muestras con Cn 5.4 y 10 8no/ul to conc 0.053 in 2x32	
$\odot$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\odot$	$\odot$	Pipette 15 µl of Muestras con Cn menores a 0.1 ng/ul + MasterMix to 96 well pl	Select the sample bank and the diluent
$\sim$	$\sim$	$\sim$	$\sim$	$\sim$	~	$\sim$	$\sim$	Pipette 15 µl of Muestras Diluidas Ch 0.1-1.3ng/ul + MasterMix to 36 well plate Pipette 15 µl of Muestras Diluidas Ch entre 1.4 y 5.3 ng/ul + MasterMix to 96 w	Diluent
$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	Pipette 15 µl of Muestras Diluidas Ch entre 5.4 y 10.6 ng/ul + MasterMix to 96	Sample bank: Muestras con Cn entre 1.4 y 5.3 ng/ul, 0 well(s)
$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\cap$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	Turning HEPA Air Filter off	
$\cup$	$\cup$	$\cup$	$\bigcirc$	$\cup$	$\cup$	$\cup$	$\cup$		Select the reaction plate to dilute into:
$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$		2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2 First well:
~	~	~	~	~	~	~	~		Select the dilution parameters to use:
								Add Edit Copy Delete Betarget ? Up	Final volume: 100
action (1.5	ōml taper	ed tube,	Generic)					Special Select All O O O Do	Desired concentration: 0.053
*	٠	۰	٥	•	÷	۰	н		Mix count 2
$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	Reaction Data	
~	0	0	~	~	~	0	Ŭ	Selecieu Fraie, 2x32 weir hip cap praie (venical, leitered culumnis) @ 62	Pipette product to a secondary plate?
$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	Plate ID	Use secondary target?
0	$\cup$	0	0	0	0	0	$\sim$	Import Export Clear	<no selection=""> First well:</no>
									Secondary volume:
									Mix count
									Advanced options
									Auto adjust small volumes to enable robot to move liquid
									Preserve source well indices?
									NOTES
									L.

Se despliega el diálogo "Sample normalization". Aquí se debe de modificar la opción "First well" de tal manera que se seleccione el PRIMER POCILLO de la selección hecha anteriormente en "Update Sample Bank" para que el equipo sepa cuál es el primer pocillo en donde debe de hacer la normalización solicitadada. En el caso del ejemplo en cuestión sería B4. Se hace click en "Ok".

### Muestras con concentración entre 5.4-10.6ng/uL

Para comenzar, haga click en el block de muestras por diluir <u>4</u>. Al hacer esto se activa el recuadro de bancos de muestras (<u>5</u>). Marque la opción "Bank Muestras con Cn 5.4 y 10.6ng/ul". Esto despliega un diálogo en dónde se hace un zoom al bloque <u>4</u>: Bloque para muestras a DILUIR en Eppendorf.

Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de ese grupo se tengan, en el caso del ejemplo serían UN pocillo. Una vez seleccionadas se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque <u>4</u> y en el <u>6</u> que hay 1 pocillo con color.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL,	VERSIÓN 16	PAGINA: 30 de 74





Se debe de tomar en cuenta de que el equipo NO NECESARIAMENTE coloca las muestras en el bloque <u>6</u> en orden, por lo que una vez que se ha hecho lo anteriormente descrito, se debe de:

Hacer click en el recuadro de <u>5</u> de Bancos de muestras y ahí seleccionar la opción "Bank Muestras <u>Diluidas</u> Cn entre 5.4 y 10.6 ng/ul". Esto despliega el diálogo en dónde se hace un zoom al bloque de muestras <u>6</u>. Se deben de marcar con el mouse cuantas muestras de este grupo se tengan, en el caso del ejemplo sería UN pocillo.

Tomar en cuenta que ya van a aparecer las muestras del primer, segundo y tercer grupo de cuantificaciones, por lo que se deben de seleccionar los pozos inmediatamente disponibles o si se desea se puede pasar a la columna siguiente y seleccionar cuantos pocillos sean necesarios. TOME EN CUENTA QUE EN LAS POSICIONES SELECCIONADAS ES EN DONDE EL EQUIPO HARÁ DILUCIONES Y SE DEBE DE COLOCAR UN EPPENDORF NUEVO. La selección hecha se ve reflejada en "List of Wells" al centro de la pantalla

Una vez seleccionados los pocillos se hace clic en el botón de la derecha "Add Selection" y por último en "Done", lo cuál devuelve a la pantalla principal. Se debe de ver reflejado en el bloque 6 y en el 7 (placa de 96) que hay, en este caso, UN pocillo más con color.

COSTA RICA		
------------	--	--

#### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACION DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

#### P-DCF-ECT-BQM-36





Seguidamente, haga clic en el bloque de muestras 6, esto cambia al recuadro de bancos de muestra (5) por el recuadro de "Reaction list" o lista de reacción. Seleccione "Normalize samples of Muestras con Cn entre 5.4 y 10.6ng/uL to conc 0.053 in 2x32well" para corroborar

el pocillo de inicio de la normalización para ese grupo:



ins toor perioritis sumpli	e-by-sample normalization into a reaction plate.	QK
Select the sample bank	and the diluent	Cancel
Diluent:	Diluent	
Sample bank:	Muestras con Cn 5.4 y 10.6 ng/ul, 0 well(s)	
Select the reaction plate	e to dilute into:	
2x32 well Flip Cap plate	(vertical, lettered columns) @ B2 First well:	
Select the dilution param	meters to use: C4	
Final volume:	200 • µl C7	
Desired concentration:	0.053  Lowest non-zero sample D1	
Mix count	2 D2 V	
Pipette product to a sec	et?	
Pipette product to a sec Use secondary targ (no selection> Secondary volume:	er?	
Pipette product to a sec Use secondary targe (no selection> Secondary volume: Mix count:	er?	
Pipette product to a sec Use secondary targe (no selection) Secondary volume: Mix count: Advanced options	er?	
Pipette product to a sec Use secondary targi (no selection> Secondary volume: Mix count: Advanced options Advanced options Adva contamination Use contamination Auto adjust small vo	er?	
Pipete product to a sec Use secondary targe (no selection) Secondary volume: Mix count: Advanced options Advanced options Adva days small vo Preserve source we IOTES:	condary plate?     er?     er?     first welt:      v     first welt:      v     (uses less lips, contaminates sample with diluent)     lumes to enable robot to move liquid     lindces?	
Pipete product to a sec Use secondary targe (no selection) Secondary volume: Mix count Advenced options Advenced options Advenced options Preserve source we DITES:	Contany plate?	

Se despliega el diálogo "Sample normalization". Aquí se debe de modificar la opción "First well" de tal manera que se seleccione el PRIMER POCILLO de la selección hecha anteriormente en "Update Sample Bank" para que el equipo sepa cuál es el primer pocillo en donde debe de hacer la normalización solicitadada. En el caso del ejemplo en cuestión sería C1. Se hace click en "Ok".

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 32 de 74

Se puede corroborar que se haya ligado correctamente la lista del bloque de muestras por diluir <u>4</u> y el bloque de muestras diluidas <u>6</u> por agregar a la placa de 96 para llevar a PCR (<u>7</u>). Esto se puede hacer colocando el mouse encima de cualquiera de los pocillos con color. Al hacer esto se refleja en la pantalla ya sea para a donde va el liquido de ese pozo o de donde vino:



¿Cómo Agregar POCILLOS EN BLANCO?

Se debe de hacer click en la placa de 96 pozos ( $\underline{7}$ ), esto despliega la lista de reacciones de la corrida en la misma posición de los bancos de muestras ( $\underline{5}$ ). Se debe de hacer click en el botón "Add...", lo cuál despliega un cuadro de dialogo en el cuál se debe seleccionar en "Samples" la opción "*No Samples (empty wells)*" (esta es la opción predeterminada). Se hace click en "OK" para volver a la pantalla principal.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 33 de 74



Esto agrega en la lista de reacciones un comando de "Skip Wells in 96 well plate (vertical)". Haciendo uso de los comandos "Up" o "Down" se puede subir o bajar este comando en la lista de acciones a llevar a cabo. Esto implica que no se puede seleccionar libremente el pocillo desde aquí, pero si se puede programar que hayan pozos vacíos (para la escalera alélica por ejemplo) al principio o al final de la placa, o entre los diversos grupos de cuantificación.

El Mover para arriba o abajo este comando se verá reflejado como un pocillo en blanco en la imagen de la placa de 96 pozos.

Este comando se puede copiar y pegar cuantas veces se necesite o desee.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 34 de 74



NOTA: La plantilla viene con CUATRO pocillos vacíos pre-programados que siempre quedaran al final de las muestras que se tengan en la corrida

¿Cómo importar los datos de la cuantificación a la corrida?

El bloque de muestras por diluir (<u>4</u>) es el que requiere que se importen los datos de cuantificación para que el equipo sepa cuanta muestra debe de tomar para hacer la dilución necesaria para llegar a 0.053ng/uL. Para hacer esto se requiere tener los datos preparados según lo explicado al principio en un documento .csv.

Se hace clic en el bloque de muestras por diluir. Esto hace que se coloree la lista de muestras de la derecha de la pantalla. Luego se hace click en "Import...", lo cual despliega el diálogo de importación de datos. En este dialogo se hace click en el botón "..." de "Import file".

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 35 de 74	

CADENA DE LA POLIMERASA



En el diálogo que se despliegue se debe de seleccionar la opción "CSV Files (\*.CSV)" de la esquina inferior derecha. Luego se busca el archivo creado previamente y se hace click en "Open" en esa misma esquina del diálogo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 36 de 74
--	------------	------------------

### PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

#### P-DCF-ECT-BQM-36

	e					8H •	
Favorites	Name	Date modified	Туре	Size			
E Desktop	1 PLANTILLAS PCR	5/26/2021 9:46 PM	File folder				
Downloads	👃 PRACTICA REAL QIA	6/3/2021 10:29 AM	File folder				
Recent Places							
Libraries							
Documents							
🕹 Music 🗏							
S. Pictures							
S Videos							
Homegroup							
Thomegroup							
Computer						-	
Local Disk (C:)	1						
MGC-BQM-16G (F							
MGC-BQM-16G (I							
MGC-BQM-16G (F	me:				· · ·	'XT Files (*.TXT)	-
MGC-BQM-16G (I	me:				$\overline{1}$	XT Files (*.TXT) SV Files (*.CSV) XT Filet (*.TXT)	•

Se vuelve a la pantalla anterior y se ve la información del archivo seleccionado. Se procede a modificar las opciones bajo "Import Options", a saber (TOME EN CUENTA QUE SE ESTÁ TRABAJANDO SOBRE EL BLOQUE DE MUESTRAS A DILUIR QE CONSISTE DE 8 COLUMNAS (1 a 8) Y POR 4 FILAS (A-D)):

- "Start importing FROM row" (comenzar a importar desde la fila ...)
- "Start importing TO well" (comenzar a importar AL POZO...)
- "Sample name from column" (nombre de la muestra de la columna...)
- "Load ID from column" (cargar identificación de la columna...)
- "Load Conc. From column" (cargar CUANTIFICACIÓN de la columna)

Tome nota de que las opciones - "Sample name from column", "Load ID from column" y "Load Conc. From column" tienen números de colores que se ven reflejados en el recuadro siguiente: "Import Preview". En este recuadro se va viendo como varia la información a importar de acuerdo a los cambios que se hagan en las opciones antes mencionadas

Tome en cuenta que la opción "Start importing TO well" se refiere al bloque de muestras POR DILUIR, por eso en el "Import Preview" solamente se ven opciones de A a D.
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 37 de 74

**CADENA DE LA POLIMERASA** 

#### Import Well Data x rt File REAL OIA/quant/quant a exportar OIA.csv SAMPLE DATA STARTS HERE Sample Name, Uuanny, .... CN-1 SANGRE, 0.00, CN-1 SANGRE, 0.00, 00, 2413541 Text Process Column Sept Lice answer 2010 Lice answer 2010 2021-016959 MPCICIO EA 10.81 10.46603 2021-02718 MUESTFA 20.21.1012345 2021-02718 MUESTFA 20.21.1012345 2021-025918 MDCIO 20.20.20.07169 2021-025918 MDCIO 20.20.21.12.2289 2021-015951 MDCIO 27.00.521.021937 2021-015951 MDCIO 27.00.521.021937 2021-015951 MDCIO 27.00.521.021937 2021-015951 MDCIO 27.00.521.021937 2021-01597 MUESTFA 21.21.0.302447 2021-02718 MUESTFA 21.21.0.30247 2021-02718 MUESTFA 21.0.20247 2021-0271 C Tab C Comma C ASCII Char. 9 -Remove from fields, se mporting FROM row: • ٠ Start importing TO well: A Name ID Conc. NO. 2.4135 THE O an from -Load ID from col 1.0123 407 V Load Conc from col 5717 84 C4 D4 A5 0.722 Specify concentration range [Min, Max]. Qancel Import

En el caso del presente ejemplo, recuerde que las TRES primeras muestras NO llevan un proceso de normalización o dilución, es por esto que se le indica al software que comience a importar la información desde la fila 5 y hacia el pocillo A1 del bloque de muestras por diluir. Se le da clic a "Import" y luego a "Finish" en la esquina inferior derecha de este diálogo.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	ст-вом-зе
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 38 de 74

CADENA DE LA POLIMERASA

Import File	File Contents
REAL QIA\quant\quant a exportar QIA.csv	Sample Name.Quantity.Degradation I SAMPLE DATA STARTS HERE
Text Processing	CN-1 SANGRE,0.00,
Column Separator	2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541
C Tab	2021-01859 INDICIO 6A 0.08,1.048603
(F Commo	2021-01588 F MS02 0 23.0 407169
C LOOMA	2021-02057 D MS1.0.24.0.571714
C ASUIChar:	2021-01859 INDICIO 78,0.32,1.325289
C Remains from fields, consents with	2021-01859 INDICIO 7A,0.53,1.021933
Premove from helds, separate with	2021-03357 AP. SANGRE 1.05.1.19078
	2021-01728 MUESTRA 2.1.21,0.88244
	CP-1 SANGRE 1 43.0 830200
Import Options	2021-02708 AP SANGRE 1 44 0 72229
Charling of a TDOM and 2	· ·
Start importing PHOM row:	
Start importing TO wall:	Import Preview
	No. Name Conc. Col. 3
V Limit sample count to 32	A1 CN-1 SAL 0
	B1 2021-015 0.05 2 413541
Sample name from column:	C1 2021-016 0.08 1.048605
	D1 2021-027 0.21 1 012345
✓ Load ID from column:	A2 2021-012 0 23 0 407160
	B2 2021 02 024 0.571714
Load Conc. from column:	C2 2221-015-0.32 1.325280
1	D2 2021-018 0.53 1 021935
Sample Bank Options	A3 2021-18: 1.05 1.190786
Add filtered rows to sample bank(s):	B3 3021-017 1.21 0.882447
R New Bank	63 2021-027 1.24 0.677165
	D3 CP-1 SAI 1.43 0.830200
0.000	A4 2021-027 1.44 0.722295
Existing Bank	84 2021-017 1.93 0.969565
· ·	C4 2021-015 3 18 0.614610
	D4 0001 011 0 01 0 0 01001
I A	U9 2021-01: 3.39 U 646/01
Banks specified in column 3     Banks named from reimbersho columns	A5 2021-025 7 0.528745
C Banks specified in column 3 C Banks named from remiber to columns Import Well Data  poot File EAL QIAlgass@gubin a exporter QIA.csv	File Contents Sample Name.Quantity.Degradation Indi
C Banks specified in column 3     C Banks nerved from rembersion columns  Import Well Data  Import File REAL QIAlgebra Quert a exporter QIA.csv	File Contents Sample Name Quantity: Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00.
C Banks specified in column 3     C Banks nemsed from reimbers to columns  Import Well Data  mport File  EAL QIAligner/Quain a exporter QIA.csv	Dia         2021-075 3.34         0.646205           A5         2021-025 7         0.528745           File Contents         Sample Name, Quantity, Degradation Inde Ch-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541
C Banks specified in column 3     C Banks named from reimbers to columns      Import Well Data      nport File REAL QIA)quest QDM a exporter QIA.csv        KA Processing      duarn Separator.	Dia         2021-076 3.34         0.646200           A5         2021-026 7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01598 H.MS01.0.05,2413541           2021-01598 H.MS01.0.05,2413541         2021-01598 H.MS01.0.05,2413541           2021-01598 H.MS01.0.05,2413541         2021-01598 H.MS01.0.05,2413541
C Banks specified in column 3 C Banks named from rembersion columns Import Well Data mport File REAL OLA JOINT OF A COLUMN COLUMN COLUMN SEARCH COLUMN COLUMN COLUMN COLUMN COLUMN COLUMN COLUMN SEARCH COLUMN	Dia         2021-026         7         0.528745           A5         2021-026         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS010.05,2.413541         2021-0398 H.MS010.05,2.413541           2021-01598 H.MS010.05,2.413541         2021-02198 H.MS010.05,2.413541         2021-02198 H.MS010.05,2.413541           2021-0198 H.MS010.05,2.413541         2021-0219 H.MS010.05,2.00,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-0219 H.MS010.05,2.00,1.012345
C Banks specified in column 3     C Banks nerred from rember to columns  Import Well Data  mport File REAL QIAlquer of QUBIT a exporter QIA.csv  Ket Processing  Data Separator.  Tab Comma	Dia         2021-022         7         0.528745           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS01.0.05,2413541         2021-01588 H.MS01.0.05,2413541           2021-02718 MUESTRA 2.0.21,1012345         2021-01588 H.MS01.0.05,2413541         2021-01588 H.MS01.0.05,2413541           2021-02718 MUESTRA 2.0.21,1012345         2021-01588 H.MS01.0.02,0407169         2021-01588 H.MS01.0.02,0407169
C Banks specified in column 3 C Banks nerred from reimbers to columns Import Well Data mport File EAL QIA/QueorQueon a exporter QIA.csv	Dia         2021-022         7         0.526742           A5         2021-022         7         0.526742           File Contents         Sample Name, Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588 H.MS01.0.05, 2.413541           2021-01858 H.MS01.0.05, 2.413541         2021-01858 H.MS01.0.05, 2.413643         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2.0.21.012345           2021-02718 MUESTRA 2.0.21.012345         2021-01698 E.MS02.03.0.407169         2021-02057 D.MS1.0240.571714
C Banks specified in column 3 C Banks named from reimborry to columns import Well Data moort File REAL QIA\queedQJBM a exporter QIA.csv exit Processing turm Separator: Tab C Comma C ASCII Char. 9	Dia         2021-012         3.3.4         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name, Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE, 0.00, 2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541         2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541           2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541         2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541         2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541           2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541         2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541         2021-01580 H,MS01, 0.05, 2.413541           2021-0257 D,MS1, 0.24, 0.051714         2021-02057 D,MS1, 0.24, 0.571714         2021-01589 INDICO 7.60, 0.21, 325289           2021-01589 INDICO 7.60, 0.21, 325289         DMS01, 0.24, 0.571714         2021-01589 INDICO 7.60, 0.21, 325289
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rembersion columns  Import Well Data  mport File REAL QIAlquerequism a exporter QIA.csv  st Processing  to on Separator:  Tab C Comma C ASCII Char: 9  Remove from fields, separate with	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-024         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-0295           2021-01598 H.MS01,0.05,2.413541         2021-02189 H.MS01,0.05,2.413541         2021-02189 H.MICO DAQ.08,1.048603           SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-0218 MUESTRA 20.21, 0.102345         2021-01598 E.MS02.0.23,0.407169         2021-021659 INDICIO A0.05,21,325289           2021-01659 INDICIO A0.52,1.325289         2021-01659 INDICIO A0.52,1.021333         2021-0357 APE SANGRE 1.05,1.1002965
Banks specified in column 3     Banks nerred from number too columns      Import Well Data      mont File REAL QIAligues of public a exporter QIA.csv      MA Processing      Marks Separator.      Tab      Comma      ASCII Char. 9      Permove from fields, separate with	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 HMS01.0.05,2413541         2021-01588 HMS01.0.05,2413541           2021-027108 MUESTRA 2.0.08,1 048503         SAMPLE DATA STARTS HERE         2021-01588 EMS02.0.20,407169           2021-027108 MUESTRA 2.0.04,07169         2021-01589 INDICIO DA 0.21,35289         2021-01589 INDICIO 7A.053,1 021933           2021-01559 INDICIO 7A.053,1 021933         2021-01559 INDICIO 7A.053,1 021933         2021-01357 AP           2021-0128 MUESTRA 2.1,21.0882447         MUESTRA 2.1,21.0882447
C Banks specified in column C Banks nerred from number to column Import Well Data Import File EAL QIA/QueorQueon a exporter QIA.csv EAC QUA/QueorQueon a exporter QIA.csv C Comma C ASCII Char: P C ASCII Cha	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name, Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE, 0.00.         2021-01588 H.MS01, 0.05, 2.413541           2021-01858 H.MS01, 0.05, 2.413541         2021-01858 H.MS01, 0.05, 2.413541         2021-01858 H.MS01, 0.05, 2.413541           2021-0218 MUESTRA 2, 0.21, 1.012345         2021-01859 INDICIO 6A, 0.08, 1.048603         SAMPLE DATA STARTS HERE           2021-0257 D.MS1, 0.24, 0.571714         2021-01659 INDICIO 7A, 0.53, 1.021833         2021-01359 INDICIO 7A, 0.53, 1.021833           2021-0357 AP, SANGRE, 1.05, 1.190786         2021-01257 M.WESTRA 2, 1.21, 0.802447         2021-02718 MUESTRA 2, 1.21, 0.802447           2021-042718 MUESTRA 2, 1.21, 0.407165         2021-01257 M.MSESTRA 1, 1.24, 0.677165         2021-01257 M.MSESTRA 2, 1.21, 0.407165
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rember two columns  Import Well Data Import File REAL QIA)queckQ2BM a exporter QIA csv C Data C ASCII Char: 9  Remove from fields, separate with	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-026         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS010.05,2.413541         2021-026           2021-01589 H.MCI D. 6A,0.08,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 20.21,1012345         2021-01588 E.MS02.0.23.0.401591           2021-01589 INDICIO F8.0.32,1.25289         2021-01589 INDICIO 78.0.32,1.25289         2021-01728 MUESTRA 21.21.0.802447           2021-01728 MUESTRA 21.1.24.0.87165         CPT-1637765         CPT-1637765           2021-01788 MUESTRA 21.1.2.0.802407         CPT-1637765           2021-01789 MUESTRA 21.21.0.802407         CPT-1637765           2021-01789 MUESTRA 21.21.0.802407         CPT-1637765           2021-01789 MUESTRA 21.21.0.802407         CPT-1637765           2021-01789 MUESTRA 21.21.0.802407         CPT-1637765
Banks specified in column 3     Banks nerred from rembersion columns      Import Well Data      mont File REAL QIAligner AQUBIT a exporter QIA.csv      Material Separator.      Tab     Comma     ASCII Char.     Permove from fields, separate with     mont Options	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588 H.MS01.0.05,2.413541           2021-0221 01588 H.MS01.0.05,2.413541         2021-02519 NIDICIO 6A.008,10.48603           SAMPLE DATA STARTS HEFRE 2021-02519 INDICIO 5A.008,10.48603         SAMPLE DATA STARTS HEFRE 2021-02519 INDICIO 7A.01521.0225289           2021-02057 D.MS1.0.24.0.57114         2021-03567 AP. SANGRE 1.05,1190766           2021-0278 MUESTRA 2.121.0.8082447         2021-02718 MUESTRA 2.121.0.8082447           2021-0278 MUESTRA 2.121.0.80200         2021-02718 MUESTRA 1.124.0.677165           CP-1 SANGRE 1.143.032000         2021-02718 AD. SANGRE 1.44.0.722292
C Banks specified in column C Banks nerred from number to column Import Well Data Import File EAL QIA/QUESTQUENT a exporter QIA.csv EAC QUANTIES C Comma C ASCII Char. P  Remove from fields, separate with Proor Options Text importing FRIOM row.	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name, Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE, 0.00.         2021-01598 H.MS01, 0.05, 2.413541           2021-01859 INDICIO 6A,0.08,1.048603         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2, 0.21, 1.012345         2021-01898 E.MS02, 0.23, 0.407169           2021-0237 D.MS1, 0.24,0.57114         2021-01859 INDICIO 7A,0.52,1.325289         2021-01859 INDICIO 7A,0.52,1.1012345           2021-01359 INDICIO 7A,0.52,1.21,2333         2021-01359 INDICIO 7A,0.52,1.102786         2021-01728 MUESTRA 2,1.21,0.802447           2021-02718 MUESTRA 1,1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1, 43,0.830200         2021-02718 AD E SANGRE 1,40,0.722292
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rember two columns import Well Data nport File REAL OLA (specific) and separator. Tab Comma C ASCII Char. 9	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE, 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021           2021-01589 H.MCIC D& AQ.08,1.048503         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02189 INDICIO 6A,0.08,1.048503         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02189 INDICIO 6A,0.03,1.048503           2021-01589 INDICIO FA,0.05,1.012345         2021-01589 INDICIO 7A,0.53,1.021933         2021-01359 INDICIO 7A,0.53,1.021933           2021-0128 MUESTRA 2,1.21,0.082447         2021-01728 MUESTRA 2,1.21,0.082447         2021-01728 MUESTRA 1,1.24,0.677165           2021-0129 MUESTRA 1,1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1,43,0.830200         2021-01708 AD, SAN/GRE 1,44,0.722292           4         Immod Preview         Immode         Immode
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rembersion columns Import Well Data mont File REAL QIAlquer Aquibit a exporter OIA.csv Met Processing burn Separator. Tab C Comma C ASCII Char. 9 Permove from fields, separate with moort Options tart importing FROM row. attrimporting TO well: A1	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541           D21-01598 P.MDICIO BAO 0.81,0.48603         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2.021,1.012345         2021-0275 D.MS1.0.24,0.57114           D21-01598 P.MDICIO DA 0.32,1.35289         2021-01598 P.MDICIO 7A.053.1.021333         2021-0327 AP. SANGRE 1.05,1.100766           D21-01278 MUESTRA 2.1.21.0.882447         2021-02718 MUESTRA 2.1.21.0.882447         2021-02718 MUESTRA 2.1.21.0.882447           D21-01278 MUESTRA 2.1.21.0.80200         2021-02718 AD.SANGRE 1.44.0.722292         4         1001
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rember two columns Import Well Data mport File EAL QIAliquestiquism a exporter QIA.csv EA Processor Comma C ASCII Char. 9 • • Remove from fields, separate with port Options tart importing FROM row. 1 • • tart importing TO well: A1 • •	Dia         2021-022         7         0.528742           A5         2021-022         7         0.528742           File Contents         Sample Name. Quantity. Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588 H.MS01.0.05.2 413541           2021-01588 H.MS01.0.05.2 413541         2021-01659 INDICIO BA.00.81.048503           SAMPLE DATA STARTS HERE         2021-02718 MUESTRA 2.021.1.012345           2021-0257 D.MS1.0.24.0.571714         2021-01559 INDICIO 78.0.32.1.325289           2021-01359 INDICIO 7A.0.53.1.021333         2021-01359 INDICIO 7A.0.53.1.021333           2021-0278 MUESTRA 2.1.21.0.802447         2021-0278 MUESTRA 2.1.21.0.802447           2021-0278 MUESTRA 2.1.21.21.0.802447         2021-0278 MUESTRA 2.1.21.20.80247           2021-0278 MUESTRA 1.1.24.0.677165         CP-1 SANGRE 1.43.0.80200           2021-0278 MUESTRA 1.1.24.0.677165         CP-1 SANGRE 1.43.0.80200           2021-0278 MUESTRA 1.1.24.0.677165         CP-1 SANGRE 1.44.0.727292           Import Preview         Inport Preview
C Banks specified in column C Banks nerved from rember two columns  mport Well Data mport File REAL QIA)queckQDBM a exporter QIA csv  A SCII Char.  Remove from fields, separate with mport Options tart importing FROM row: Tath importing FROM row: Tath importing TO well: Lati importing TO well	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE, 0.00, 2021-01588 H.MS010, 05,2.413541         2021-022           2021-01598 H.MS010, 05,2.413541         2021-021991         2021-02191           2021-01598 H.MS010, 05,0.08,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-0219 MUESTRA 20, 21, 1012345         2021-01589 INDICIO R0, 02,1.25289           2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.25289         2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.25289         2021-01278 MUESTRA 21, 21, 0.802447           2021-01278 MUESTRA 21, 21, 0.802447         2021-0277 AP. SANGRE 1, 05,1190786         2021-037165           CP1 SANGRE 1, 43,0.830200         2021-01708 AP. SANGRE 1, 44,0 729292         4         Import Preview           Import Preview         No         Name         Conc.         Col. 3         41
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rembersion columns Import Well Data Import File REAL QAAque sequibit a exporter OIA.csv Import Separator. Tab Comma C ASCII Char. Permove from fields, separate with Import Options Retrimporting FROM row. Retrimporting TO well: A1 Unit sample count to:	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021           1221-015939 INDICI 0.60.08,1.048603         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02519 INDICI 0.60.21,0.2522           2021-02719 MUESTRA 2.021,0.101345         2021-01598 E.MS02,0.23,0.407163           2021-0257 D.MS1.0.24,0.57114         2021-01598 INDICI 0.76,0.32,1.352289           2021-0157 AP. SANGRE 1.05,1.102783         2021-0375 AP. SANGRE 1.05,1.100766           2021-01728 MUESTRA 2.1 21,0.882447         2021-0178 MESTRA 2.1 21,0.882447           2021-02708 AP. SANGRE 1.05,1.032200         2021-0278 AP. SANGRE 1.05,1.032200           2021-0278 JAP. SANGRE 1.1.1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1.1.43,0.80200           2021-02708 AP. SANGRE 1.1.1.012343         MUESTRA 2.1 21,0.882447           2021-02708 AP. SANGRE 1.1.1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1.1.1.24,0.677165           CP-1 SANGRE 1.1.1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1.1.1.24,0.677165           Import Preview         No. Name         Conc. Col. 3           A1         2021-0120         0.21         1.012345           B1         2021-015         0.23         0.407165
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rember to columns Import Well Data mont File EAL QIAlique strategy burn Separator. Tab C Comma C ASCI Char. 9 C Comma C ASCI Char. 9 C C Char. 9 C Cha	Dia         2021-022         7         0.528744           A5         2021-022         7         0.528744           Sample Name.Ouently.Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-022         7         0.528744           2021-01588 H.MS01.0.05.2 413541         2021-01588 H.MS01.0.05.2 413541         2021-01588 H.MS01.0.05.2 413541           2021-0259 INDICI D.60.008.1 048503         SAMPLE DATA STARTS HERE         2021-0259 INDICI D.60.008.1 048503           2021-0257 D.MS1.0.24.0.571714         2021-0159 INDICI D.60.32.1 352589         2021-01357 AP. SANGRE 1.06.1 190786           2021-01359 INDICI D.70.05.3.1 021933         2021-01359 INDICI D.60.32.1 352589         2021-01367 AP. SANGRE 1.1.6.1 190786           2021-01359 INDICI D.70.05.3.1 0.21933         2021-0127 B.MUESTRA 1.1.2.4.0.677165         CP-1 SANGRE 1.4.0.677165           CP-1 SANGRE 1.4.0.677165         CP-1 SANGRE 1.4.0.677165         CP-1 SANGRE 1.4.0.77165         CP-1 SANGRE 1.4.0.677165           Import Preview         No. Name         Conc.         Col. 3         A1         2021-022         0.21         0.4077165           Import Preview         No. Name         Conc.         Col. 3         A1         2021-022         0.23         0.4077165           C1         2021-0022         0.24         0.571714         2021-0022         0.24         0.571714         <
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rember two columns import Well Data nport File SEAL O(A)queor(q)2011 a exporter O(A cov) export Separator. Tab C Comma C ASCII Char: 9 * Remove from fields, separate with Remove from fields, separate with Remove from fields, separate with To b	Dia         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS010.05,2.413541         2021-022         7           D21-01598 H.MS010.05,2.413541         2021-021         1012345         2021-021           D21-01598 H.MS010.05,2.413541         2021-01599 INDICIO 6A,0.08,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE           D21-01218 MUESTRA 2.0 21,1.012345         2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.25289         2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.25289           2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.325289         2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.325289         2021-0178 MUESTRA 2.1.21,0.082447           2021-0129 MUESTRA 1.1.24,0.677165         CP-1 SANGRE 1.43,0.930200         2021-0176 MUESTRA 1.1.24,0.677165           CP1 SANGRE 1.43,0.930200         2021-0176 J.P. SANGRE 1.44,0.722292         1         1012345           Mo         Name         Conc.         Col.3         4           MO         Name<
C Banks specified in column C Banks nerred from rember to columns  Import Well Data  Import File  EAL QAIgds of QUBIT a exporter QIA.csv  As Flocestang  Darm Separator:  Tab Comma C ASCII Char: P  Remove from fields, separate with  P  Comma Flocestang C ASCII Char: P  C Comma C C Comma C C C Comma C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name.Quantity.Degradation Indi CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588         H.MS01,0.05,2.413541           2021-01588         H.MS01,0.05,2.413541         2021-0259         1012345           2021-0259 INDICI 06 A0.08,1.048603         SAMPLE DATA STARTS HERE         2021-02169         1012345           2021-0257 D.MS1,0.24,0.57114         2021-02169 INDICI 07 A0.53,1.021933         2021-0359 INDICI 07 A0.53,1.021933         2021-0325 AP. SANGRE 1.05,1.190786           2021-0278 MUESTRA 2,1.21,0.882447         2021-0278 MUESTRA 2,1.21,0.882447         2021-02718 MUESTRA 1,21.0.80200           2021-0278 MUESTRA 1,3.030200         2021-0270 R.P. SANGRE 1.44.0.722292         1012345           Minort Preview         No. Name         Conc.         Col. 3           A1         2021-025         0.21         1.012345           B1         2021-015         0.23         0.407165           C1         2021-027         0.21         1.012345           B1         2021-015         0.32         1.325285           A2         2021-015         0.32         1.325285
C Banks specified in column 3 C Banks nerved from rembersion columns Import Well Data mont File EAL QIAligue stights a exporter QIA.csv EA Plocestorg burn Separator. Tab C Comma C ASCII Char. 9 • • Remove from fields, separate with mont Options tart importing FROM row: East importing TO well: Lati Limit sample count to: C Sample name from column: C ASCII Char. 9 • • Lati importing TO well: Lati Limit sample count to: C Sample name from column: C ASCII Char. 9 • • Lati importing TO well: Lati C Sample name from column: C ASCII Char. 9 • • Comma C ASCII	Dial         2021-022         7         0.528745           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name.Ouently.Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-022         7         0.528745           Sample Name.Ouently.Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588 H.MS01.0.05.2.413541         2021-01588 H.MS01.0.05.2.413541           2021-02718 MUESTRA.2.0.21.1.012345         2021-01589 INDICI O.0.08.1.048503         2021-0257 D.MS1.0.24.0.571714           2021-0259 INDICI O.0.32.1.35289         2021-0159 INDICI O.0.32.1.35289         2021-01258 MUESTRA.2.1.21.0.802447           2021-01258 MUESTRA.2.1.2.1.0.802447         2021-01278 MUESTRA.2.1.2.1.0.802447         2021-02718 MUESTRA.2.1.2.1.0.802447           2021-02718 MUESTRA.2.1.2.1.0.802447         2021-02718 MUESTRA.1.1.2.4.0.677165         CP-1 SANGRE.1.4.0.677165           CP-1 SANGRE.1.4.0.672165         CP-1 SANGRE.1.4.0.677165         CP-1 SANGRE.1.4.0.677165           CP-1 SANGRE.1.4.0.677165         CP-1 SANGRE.1.4.0.677165         CP-1 SANGRE.1.4.0.677165           CP-1 SANGRE.1.4.0.677165
C Banks specified in column 3 C Banks named from rember two columns import Well Data nport File search of the second seco	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-022           12021-01598 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021 NUESTRA.2.021,1012345           2021-021 BMUESTRA.2.021,1012345         2021-021 BMUESTRA.2.021,1012345           2021-01599 INDICIO FB.0.32,1.325289         2021-0159 INDICIO 76,0.32,1.325289           2021-0127 DMS1.0.240571714         2021-0128 MUESTRA.2.1.21,0.882447           2021-021 BMUESTRA.2.1.21,0.882447         2021-021 BMUESTRA.2.1.21,0.882447           Import Preview         No. Name         Conc.         Col.3           A1         2021-022 0.21         1.012345         B1         2021-021 B           C1         2021-022 0.21         1.021935         B2         2021-016         0.32         1.325286           A2         2021-021 O.23         0.407165         C1         2021-021 B         0.53         1.0219335           B2         2021-045         0.53         1.30219335         B2         2021-045         0.51         1.00786           C1         2021-045         0.53         1.0219335         B2         2021-045         0.51         1.
C Banks specified in column 3 C Banks nerred from rembersion columns Import Well Data Import Well Data Import File REAL QIAlgdor (QUBIT a exporter QIA.csv) Import Separator: Tab Comma C ASCII Char: Permove from fields, separate with C Comma C ASCII Char: Permove from fields, separate with C Limit sample count to: C C Comma C Limit sample count to: C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name.Ouentity.Degradation Indi CN-1 SANGRE.0.00.         2021-01588         H.MS01,0.05,2.413541           D21-01588         H.MS01,0.05,2.413541         2021-0259         NIDICIO BA.008,1.048603           SAMPLE DATA STARTS HERE         2021-0218 MUESTRA 2.0.21,1012345         2021-02189         NIDICIO RA.012,1.35289           2021-0218         MUESTRA 2.0.21,1012345         2021-0218 MUESTRA 2.0.21,1012345         2021-02178           Z021-0278         MUESTRA 2.1.21,0.882447         2021-0278         MUESTRA 1.21,0.0821435209           Z021-0278         MUESTRA 1.21,0.082143         2021-0278         2021-02716         2021-02716           Import Preview         No. Name         Conc.         Col. 3         A1         2021-026         0.21         1.012345           B1         2021-015         0.23         0.407165         C1         2021-027         0.21         1.012345           B1         2021-015         0.23         0.407165         2021-027         2021-027         0.517174           D1         2021-015         0.32         1.325285         A2         2021-015         0.33         1.021933         B2         <
C Banks specified in column 3 C Banks nerred from rembersion columns import Well Data mont File REAL QIAligner of QUBIT a exporter QIA.csv	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021           12021-01598 H.MS01,0.05,2.413541         2021-0218 MUESTRA 2.0.21,1.012345           2021-02718 MUESTRA 2.0.21,1.012345         2021-0159 INDICI 0.60.32,1.35289           2021-0257 D.MS1,0.24,0.571714         2021-0159 INDICI 0.74,0.53,1.021333           2021-0159 INDICI 0.74,0.53,1.021333         2021-0357 AP, SANGRE 1.05,1.190766           2021-01278 MUESTRA 2.1.2,1.0.882447         2021-02718 MUESTRA 2.1.2,1.0.882447           2021-0278 MJESTRA 2.1.2,1.0.80200         2021-02718 MUESTRA 2.1.2,1.0.802447           2021-0278 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02718 MUESTRA 2.1.2,1.0.802447           2021-0278 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02718 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447           2021-0278 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02718 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447           2021-02710 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02710 J.1.2,1.0.802447           2021-02710 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02710 J.1.2,1.0.802447           2021-02710 MJESTRA 2.1.2,1.0.802447         2021-02710 J.2.2,0.0021           12021-0270 J.2.1         1.0.21345           B1         2021-0121         1.0.21345           B1         2021
C Banks specified in column 3 C Banks named from rember two columns import Well Data nport File SEAL O(A)quere/Q2BM a exporter O(A csv	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Inde CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-022           12021-01593 INDICIO 6A,0.08,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2.021,1.012345         2021-01593 INDICIO 6A,0.08,1.048003           2021-01599 INDICIO FA,0.08,1.048003         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2.021,1.012345         2021-01593 INDICIO 78,0.32,1.325289           2021-01599 INDICIO 78,0.32,1.325289         2021-01728 MUESTRA 2.1,21,0.802447         2021-01728 MUESTRA 2.1,21,0.802447           2021-0210 MUESTRA 1.1,24.0,677165         CP1 SANGRE 1.43,0.830200         2021-0210400         2.01           1         Import Preview         No         Name         Conc.         Col.3           11         2021-0210         0.21         1.021935         1.021935         2.2021-001           12         2021-0210         0.21         1.022445         2.021-001         0.21         1.021935           12         2021-0210         0.24         0.577114         1.021935         2.2021-001         0.21         0.22586           2         2021-0210         0.53         1.100786         2.2021-021         0.40         0
C Banks specified in column C Banks nerred from rember two columns  mport Well Data  mport File EAL QAIndersequibit a exporter QIA.csv  Met Processing  Darm Separator:  Tab Comma C ASCII Char: P  Remove from fields, separate with C Comma C ASCII Char: P  Remove from fields, separate with C Comma C ASCII Char: C Comma C ASCII Char: C Comma C C Comma C C Comma C C C Comma C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity, Degradation Indi CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-01589 H.MC0 0.81,048603           SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-0278 MUESTRA 2.02.1,1012345         2021-01598 E.MS02,0.23,0.407169           2021-0218 BILLCO RAD, 20,21,012345         2021-01599 INDICIO RAD, 20,21,012345           2021-0218 PMUESTRA 2.02.1,1012345         2021-0128 MUESTRA 2.1,21,0.882447           2021-02178 MUESTRA 2.1,21,0.882447         2021-0278 MUESTRA 2.1,21,0.87165           CP-1 SANGRE 1.43,0.830200         2021-02708 AP, SANGBE 1.44,0.772592           MID         Conc.         Col. 3           A1         2021-021 0,021 0,22         0.407165           C1         2021-0015 0,32         1.325285           A2         2021-015         0.21         1.021435           B1         2021-015 0,23         0.407165         1.325285           A2         2021-015 0,33         1.021933         2021-021 1,21         0.882447           D2         2021-002 1,24         0.6777165         1.30786           C2         2021-002 1,24         0.6777165           C3         CP-1 SAV1,43         0.830200           C2
C Banks specified in column 3 C Banks nerred from rembersion columns import Well Data mont File REAL QIAlgae AQUENt a exporter OIA.csv	Dial         2021-072         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           Sample Name Quantity/Degradation Inde CN-1 SANGRE 0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2413541         2021-02718         2014059           1221-015939 INDICIO 6A.008,10.48503         SAMPLE DATA STARTS HERE 2021-02718 MUESTRA 2.021,1.012345         2021-02719           2021-02719 MUESTRA 2.02,1.1012345         2021-0259 INDICIO 7A.0531,02403714         2021-0259 INDICIO 7A.0531,021335209           2021-02718 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-01728 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-01728 MUESTRA 2.12,1.0.802447           2021-02718 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-02718 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-02718 MUESTRA 2.12,1.0.802447           2021-0278 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-02718 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-027102           2021-0278 MUESTRA 2.12,1.0.802447         2021-027108 M.UESTRA 2.12,1.0.802447         2021-027102           2021-02710 MUESTRA 2.12,0.802447         2021-027104         2021-027155           CP-1 SANGRE 1.44.0.877165         CP-1 SANGRE 1.14.0.777165           A1         2021-0021 0.21         1.021345           B1         2021-016         0.3         1.325286           A2         2021-016         0.3         1.325286           A2         2021-016         0.5 <t< td=""></t<>
C Banks specified in column C Banks named from rember to columns  mport Well Data  mport File  EAL QIA/queof/qJam a exporter QIA.csv  ABL Comma C ASCII Char.  P  Remove from fields, separate with  mport Options  tant importing FROM row:  C Sample name from column:  C Load ID from column:  C Load Conc. from column:  C Load Conc. from column:  Add filtered rows to sample bank(s):  Mer Bank C Existen C Existen Bank C Existen Bank C Existen Bank C Existen	Dial         2021-012         3.34         0.646205           A5         2021-022         7         0.528745           File Contents         Sample Name Quantity, Degradation Ind CN-1 SANGRE.0.00, 2021-01588 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021           12021-01598 H.MS01,0.05,2.413541         2021-021         10.12345           2021-01598 H.MS01,0.05,2.413541         2021-01598 M.MS01,0.05,2.413541           2021-01598 J.NDICIO BA.0.08,1.048503         SAMPLE DATA STARTS HERE           2021-01599 INDICIO FB.0.32,1.325289         2021-01599 INDICIO 76,0.32,1.325289           2021-0127 D.MS 10.240 571714         2021-0127 M.UE STRA 2,1.21,0.882447           2021-027 PL SANGRE 1.43.0.830200         7792497708 AD SANGRE 1.44.0.729292           MINDER TRA 1,1.240.677165         CP1 SANGRE 1.43.0.830200           7791-02700 AD SANGRE 1.44.0.729292         4           MINDER TRA 2,1.21.0.82447         D2 2021-0021 0.24           2021-0021 0.24         0.5711714           D1         2021-0021 0.24         0.5717174           D2         2021-0021 0.24         0.571714           D2         2021-0021 0.24         0.571714           D2         2021-0021 0.24         0.571714           D2         2021-0021 0.24         0.571714           D2         2021-0021 0.24

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	СТ-ВQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 39 de 74

NOTA: Observe que en la figura de arriba en el recuadro "File Contents" hay una fila que dice "SAMPLE DATA STARTS HERE" la cuál se va a mover a la fila anterior de donde se comenzará a importar los datos.

Si se quisiera importar un dato en especial a un pocillo especifico solamente se deben de modificar los parámetros antes mencionados. En este ejemplo, se colocó a la única muestra del grupo de 5.4-10.6ng/uL en una columna aparte (columna 4, posición A). Por eso a la hora de importar los datos desde la hoja de CSV esta muestra podría quedar sin información. Para importar los datos de esta muestra en particular se le indica al programa que importe los datos a partir de la fila en la cual se tiene el dato de la muestra (fila 18) y que empiece a hacer la importación en la posición A4. Esto hace que se importe el dato único necesario:

ort File AL OIA/guenfiguent e exporter OIA.csv	File Contents 2021-02718 MUESTRA 2.0.21.1.012345		Import	L. Export. Q	ear (selects	ample bank
Processing mn Separator.	2021-01588 E MS02.0 23.0 407169 2021-02057 D MS12.0 24.0 571714 2021-01659 INDICIO 740. 0321. 125289 2021-01659 INDICIO 740. 0321. 125289 2021-01357 A SANCRE I D51.190766		iplay Groe	C Label Sequence	e @ Pipetir	ig Sequence
Comma ASCII Cher. 9	2021-01728 MUESTRA 2.1.21.0.882447 2021-02718 MUESTRA 1.1.24.0.677165 CP-1 SANGRE,1.43.0.830200	н	Well	Sample Name	Sample ID	Conc.
emove from fields, separate with	2021-02708 AP: SANGRE 1.44.0.722292 2021-01729 MUESTRA 1.1.93.0.969565 2021-01588 G.MS01.3.18.0.614610		A1	2021-02718 MUESTRA 2	2021-02718 MUE	0.21
Options	2021-01568 FIMSU2.3.3-00.0496.05 SAMPLE DATA STARTS HERE 2021_02548 FIMS1 7.00.0.528745		B1	2021-01588 E.MS02	2021-01588 E.M	0.23
porting FRC 4 row: 18	* III	< N	C1	2021-02057 D.MS1	2021-02057 D.M	0.24
Ionting TO vall: A1	No. Name Conc. Col. 3 A1 2021-025 7 0.528745		D1	2021-01859 INDICIO 7B	2021-01859 INDI	0.32
ple name t m column C4			A2	2021-01859 INDICIO 7A	2021-01859 INDI	0.53
IID from courms: B5			82	2021-03357 AP. SANGRE	2021-03357 AP. 1	1.05
I Conc. from column:	J		C2	2021-01728 MUESTRA 2	2021-01728 MUE	1.21
Bank Options filtered rows to sample bank(s):			02	2021-02718 MUESTRA 1	2021-02718 MUE	1.24
w Bank			A3	CP-1 SANGRE	CP-1 SANGRE	1.43
sting Benk			83	2021-02708 AP. SANGRE	2021-02708 AP :	1.44
nks specified in column: 3			C3	2021-01729 MUESTRA 1	2021-01729 MUE	1.93
ks named form membership columns			D3	2021-01588 G MS01	2021-01588 G M	3.18
,	N		A4	2021-01588 H MS02	2021-01588 H M	3.34
ry concentration range [Min, Max].			B4	2021-02648 B MS1	2021-02648 B M	7
Concentration:			CA	Sample C4 @ 42	ever 02000 0 m	0
se selected wells OUTSIDE range		Quart 1 hand 1	-	compre ou Graz		
nbers of selected bank columns only		Zauces Import	46	Sample D4 gr/2	2024 026 48 B M	7
	$\sim$		~	2021-02046 B.MS1	2021-02648 B.M	
		1	-			and the second

NOTA: Si se ha hecho una importación previa de datos esta no se perderá a no ser que la nueva importación sea exactamente en los mismos pocillos. Es por esto que se pueden hacer varias importaciones definiendo diferentes lineas.

Si se desea importar el nombre o la identificación de muestra al bloque de muestras diluidas (<u>6</u>) se repiten los mismos pasos ya mencionados pero seleccionando a este bloque de muestras desde el principio y luego repitiendo el proceso de importación. Se debe de desmarcar la opción de importar las concentraciones para solo importar las identificaciones.

## Iniciar la corrida

\*\*RECUERDE DE INICIAR LOS 15 MINUTOS DE LUZ UV DEL EQUIPO ANTES DE INTRODUCIR LAS MUESTRAS O REACTIVOS\*\*

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	ст-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 40 de 74

Una vez lista la programación de la corrida se procede a comenzar la corrida. Haga click en el ícono del papel rasgado para generar el reporte de precorrida que le indicará cuanto diluyente y cuanto master mix requiere, además de cuanta cantidad de muestra tomará de cada tubo de muestras.

G	UIA Plantilla GF Normalizacion + PCI	R (RC) (10.6ng pc	or ul) 2021-06-03 14-06-23.OAS - OLAgility [VIR]	
N	File Control Wizards Options	Help		
	2 5		2 9 2	
				4
Robot Table	Setup			N'
Position :	M1 Plate = Mix plate (5 t Adaptor = 9018958 (	ube positions) Corbett: 0003)	(Master Mix Block, 1x5ml, 4x1.5ml Tubes)	
Descriptic Manufactu	on 1 x QIAGEN QIAgility 5ml rer QIAGEN	. 4 x QIAGEN 1.5r	nl Tapered Screw Cap Tubes	M1 A A2 B B2 R1 C1 C2
Well	Tube		Contents	User supplied initial volume
D	1.5ml tapered screw cap tube	Diluent		857.44 μl + 15 μl = <b>872.44 μl</b>
Position :	R1 Plate = Reagent bloc Adaptor = 9018951 (	k (standard 20 Corbett: 0004)	00,flat,tapered) (Reagent Block, 1 <i>6</i> x0.2mi PCR 8x2ml/1.5ml Flat	/Tapered)
Descriptio	n 16 x QIAGEN 200μl, 8 x G	AIAGEN 2ml Free	Standing, 8 x QIAGEN 1.5ml Tapered Tubes	M1 A1 A2
Manufactu	IEI GIAGEN			R1 B1 B2 C1 C2
Woll	Tubo		Contents	Licer supplied initial volume
Weil	1 5ml tapered hinged tube	MasterMix	Contents	210 ul + 15 ul = 225 ul This reagent is viscous

Tome en cuenta que el equipo siempre le indica en que posición general debe de colocar los liquidos a trabajar. Se indica cuánto volumen como mínimo deben de tener cada uno de los tubos de diluyente o de reactivos.

El reporte de pre corrida indica además los volúmenes mínimos de muestra que se van a tomar y el volumen mínimo que debe de tener el tubo de muestra:

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	T-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 41 de 74

Position : A2Plate = 32 well Flip Cap plate (vertical) Adaptor = 9018927 (Corbett: 2627) (Flip-Cap 32x1.5ml Tapered-Base)					
Descriptio Manufactu	on 32 QIAGEN 1.5ml Flip Cap T rer QIAGEN	apered Tubes	м	1 A1	A2
			R	B1	B2
				C1	C2
Well	Tube	Contents	User supplied initial volume		
A1	1.5ml tapered hinged tube	2021-02718 MUESTRA 2	6.31 μl + 15 μl = <b>21.31 μ</b> l		
B1	1.5ml tapered hinged tube	2021-01588 E.MS02	5.76 μl + 15 μl = <b>20.76 μl</b>		
C1	1.5ml tapered hinged tube	2021-02057 D.MS1	5.52 μl + 15 μl = <b>20.52 μl</b>		
D1	1.5ml tapered hinged tube	2021-01859 INDICIO 7B	4.14 μl + 15 μl = <b>19.14 μl</b>		
A2	1.5ml tapered hinged tube	2021-01859 INDICIO 7A	2.5 μl + 15 μ <b>l = 17.5 μl</b>		
B2	1.5ml tapered hinged tube	2021-03357 AP. SANGRE	1.26 μl + 15 μl = <b>16.26 μl</b>		
C2	1.5ml tapered hinged tube	2021-01728 MUESTRA 2	1.1 ш + 15 ш = <b>16.1 ш</b>		
D2	1.5ml tapered hinged tube	2021-02718 MUESTRA 1	1.07 μl + 15 μl <b>= 16.07 μl</b>		
A3	1.5ml tapered hinged tube	CP-1 SANGRE	3.71 μl + 16 μl = <b>18.71 μl</b>		
B3	1.5ml tapered hinged tube	2021-02708 AP. SANGRE	3.68 μl + 15 μl = <b>18.68 μl</b>		
C3	1.5ml tapered hinged tube	2021-01729 MUESTRA 1	2.75 μl + 15 μl = <b>17.75 μl</b>		
D3	1.5ml tapered hinged tube	2021-01588 G.MS01	1 67 μl + 15 μl = <b>16.67 μl</b>		
A4	1.5ml tapered hinged tube	2021-01588 H.MS02	1.59 μl + 15 μl = <b>16.59 μl</b>		
A5	1.5ml tapered hinged tube	2021-02648 B.MS1	1.51 μl + 15 μl = <b>16.51 μl</b>		

En la primera línea por ejemplo, de la muestra "2021-02718 MUESTRA 2" el equipo tomará 6,31uL para la dilución, el equipo requiere 15uL de exceso de muestra para un total de 21,31uL mínimo que deben de estar en el tubo de muestra.

De los últimos datos del pre reporte a resaltar se tiene que el equipo indica la cantidad de puntas de 200uL y de 50uL que va a requerir y además hace un resumen de los pasos que va a tomar

Tips	;		6			
	MI					
				R1	B1	B2
			$\mathcal{I}$		C1	C2
Position	Tips Required		Contents			
A1	2		200 µl Tips			
B1	34		0 µl Tips			

#### Reaction steps / Task list

Inserting 10 µl MasterMix Normalize samples of Muestras con Cn 0.1-1.3ng/ul to conc 0.053 Normalize samples of Muestras con Cn entre 1.4 y 5.3ng/ul to conc 0.053 Normalize samples of Muestras con Cn 5.4 y 10.6ng/ul to conc 0.053 Inserting 15 µl Muestras con Cn menores a 0.1ng/ul from intermediate plate Inserting 15 µl Muestras Diluidas Cn 0.1-1.3ng/ul from intermediate plate Inserting 15 µl Muestras Diluidas Cn entre 1.4 y 5.3 ng/ul from intermediate plate Inserting 15 µl Muestras Diluidas Cn entre 5.4 y 10.6 ng/ul from intermediate plate Inserting 15 µl Muestras Diluidas Cn entre 5.4 y 10.6 ng/ul from intermediate plate

Monte todos los consumibles y muestras en el equipo: Introduzca las muestras que no ocupan dilución en el bloque 6 y después la cantidad de tubos vacíos necesarios y en el orden pre definido. Monte la placa de 96 para PCR en su posición y por último monte los tubos de las muestras a diluir según se requiera y en el orden preciso.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	T-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 42 de 74

A continuación, haga clic en el ícono de la flecha verde.

File Control Wizards Options Help								
	<b></b>	2	S 🖗	<b>%</b>				

Al finalizar la corrida guarde el reporte post corrida y retire los tubos. Recuerde iniciar el ciclo de Luz UV para el equipo.

Interpretación del reporte de post corrida

El equipo brinda un reporte post-corrida que se debe de guardar y adjuntar al legajo digital. Este reporte indica todo lo que sucedió en la corrida, incluyendo de dónde y hacia adónde se movieron los diversos líquidos.

En el primer recuadro "Position: B2-2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns)" se resumen los volumenes que se toman de las muestras y de diluyente así como la concentración final que se obtiene. Respecto a los 10 uL que indica el reporte que quedan en las posiciones normalizadas este es el volumen restante después de agregar los 15uL a la placa de reacción de 96 pocillos.

Positi	on : B2 - 2x3	2 well Flip Cap plate (vertical, lette	ered columns				
Well	ID	Expected Contents	Actual Contents	Conc.	Max Working Volume	Final Volume	Status
A1	CN-1 SANGRE	Empty (Used)	Empty (Used)		15 µl	0 μΙ	ОК
A2	2021-01588 H.MS01	Empty (Used)	Empty (Used)		15 µl	0 µl	ОК
A3	2021-01859 INDICIO 6A	Empty (Used)	Empty (Used)		15 µl	0 µl	ОК
A4	2021-02718 MUESTRA 2	7.48 µl Diluent 2.52 µl 2021-02718 MUESTRA 2	7.48 μl Diluent 2.52 μl 2021-02718 MUESTRA 2	0.0530	25 µl	10 µl	ОК
<b>A</b> 5	2021-01588 E.MS02	7.7 µl Diluent 2.3 µl 2021-01588 E.MS02	7.7 µl Diluent 2.3 µl 2021-01588 E.MS02	0.0530	25 µl	10 µl	ОК
A6	2021-02057 D.MS1	7.79 µl Diluent 2.21 µl 2021-02057 D.MS1	7.79 μl Diluent 2.21 μl 2021-02057 D.MS1	0.0530	25 µl	10 µl	ОК

Ejemplo: Para la muestra "2021-02718 MUESTRA 2" los 10 uL en "Final Volume" se explican en "Actual Contents" en donde se indica que esos 10uL equivalen a que se tomen 2,52uL de muestra y se le agregan 7,48uL de diluyente. Sabemos que la concentración ("Conc.") de esa muestra es 0,2100ng/uL. Al tomar 2,52uL de la muestra tenemos en el tubo: 2,52uL x 0,21ng/ uL = 0,5292ng de ADN. Al tomar en cuenta que agregamos 7,48uL de diluyente entonces la concentración final en ese tubo de muestra ya diluida será: 0,5292ng de ADN x (2,52uL + 7,48uL) = 0,0530ng/uL.

Esto se repite para las demás muestras programadas para tener una concentración final de 0,053ng/uL. Esta concentración es la necesaria para que al tomar 15uL de la misma se tengan 0,8ng de ADN para la reacción de PCR: 0,053ng/uL x 15uL = 0,8ng.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 43 de 74

El segundo recuadro "Position: C1 – 96 well plate" indica los volumenes finales presentes en cada pocillo de la placa de 96.

Positi	Position : C1 - 96 well plate (vertical)								
Well	ID	Expected Contents	Actual Contents	Conc.	Max Working Volume	Final Volume	Status		
D1	CN-1 SANGRE	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A1	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A1	4	25 µl	25 µl	ОК		
E1	2021-01588 H.MS01	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical. lettered columns) @ B2, Well A2	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A2	$\mathbf{Q}$	25 μl	25 µl	ОК		
F1	2021-01859 INDICIO 6A	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A3	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A3		25 µl	25 µl	ОК		
G1	2021-02718 MUESTRA 2 2021-02718 MUESTRA 2	10 µl MasterMix 15 µl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A4	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ B2, Well A4	0.0318	25 µi	25 µl	ок		
H1	2021-01588 E.MS02 2021-01588 E.MS02	10 µl MasterMix 15 µl 2x32 well Flip Cap plate (vertical. lettered columns) @ B2, Well A5	10 μl MasterMix 15 μl 2x32 well Flip Cap plate (vertical, lettered columns) @ 82, Well A5	0.0318	25 µl	25 µl	ОК		

En este ejemplo, las primeras muestras (D1-F1) no tienen información de "Conc." debido a que como están en el primer grupo de cuantificación (<0,1ng/uL) el equipo solamente toma 15uL de muestra directa.

Si tomamos el ejemplo de la muestra "2021-02718 MUESTRA 2", sabemos que la concentración de ADN contenida en el tubo diluido (ver arriba) es de 0,53ng/uL. Porqué se tiene en "Conc." 0,318 para esta muestra? Esto se debe a que si se toman 15uL de muestra tendríamos 0,053ng/uL x 15uL = 0,795ng de ADN y si se diluye en 25uL de volumen final de reacción tenemos 0,795ng ( 25uL = 0,0318ng/uL.

Esto se repite para las demás muestras programadas.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 44 de 74	

## Anexo No. 3

## Pipeteador automatico Hamilton, Nimbus

## **1** Preparación del equipo

CADENA DE LA POLIMERASA

- **1.1** Colóquese el equipo de protección e ingrese a cualquier cuarto de PCR en el área de pre-amplificación.
- **1.2** Encienda el Nimbus primero mediante el botón de encendido del filtro HEPA que se encuentra ubicado en la parte superior, derecha y trasera del equipo (ver figura 1), seguidamente encienda el botón de encendido ubicado en la parte delantera, en la esquina inferior derecha.



Figura 1. Botón de encendido ubicado en la parte de trasera y superior derecha del equipo.

- **1.3** Encienda la computadora y acceda al software *Method Manager* utilizando el icono en el escritorio.
- **1.4** Se abrirá el Menú Principal.
  - 1.4.1 Recuerde encender la luz UV al menos 15-20 min al inicio y al finalizar una corrida de muestras en el equipo. La luz UV se controla desde la aplicación en la pestaña de "UV LIGHT". La aplicación tiene por defecto el tiempo de irradiación en 60 min, por lo que es importante modificarlo al tiempo recomendado en el procedimiento.
- **1.5** Antes de procesar muestras, se debe realizar el mantenimiento diario, mediante la opción de "Maintenance", "Daily Maintenance", luego en "Maintenance Type" seleccione "Daily". De click a cada casilla conforme va realizando cada una de las actividades.

**Nota 1:** Los mantenimientos programados y semi-anuales son realizados por los encargados de soporte técnico del equipo, por lo que solo se realizará el mantenimiento diario cada vez que se va a iniciar un montaje.

**Nota 2:** La limpieza del dock metálico debe ser con etanol al 70% y DNA Away, al finalizar debe quedar bien seco mediante el uso de toallas desechables KimWipes.

**1.6** Seguidamente se dará clic en "Normalization" para iniciar la preparación del equipo para cuantificar muestras. (ver figura 2)

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 45 de 74	

Method Manager							- a x
HAMILTON							Simulation On Settings
All Recent The	Maintenance	<b>Installation</b>					Folders Editors
Thermo HID Z Quantifica	tion	1	Normalization	Themo HID Lienar Placas	1	Thermo HID Reports Folder	1
Thermo HID UV LIGHT		t				Ac	

Figura 2. Menú Principal de la aplicación "Method Manager" Versión 4.4.2

- **1.7** Una vez que se seleccione el menú de "Normalization" se deberá realizar la configuración del método de trabajo: (ver figura 3
  - A) Seleccionar el archivo de cuantificación con el listado de las muestras, en formato .xls.
  - B) Indicar el archivo de resultado del termociclador (ABI7500 o QS5), en formato .txt.
  - C) Seleccionar el kit de normalización: GF o YFP.
  - D) Seleccionar la presentación del tubo de muestras: placa o tubo 1.5mL.
  - E) Indicar la concentración de entrada máxima del kit (ng/uL): 0,066.
  - F) Seleccionar el destino de la amplificación: placa o tira de tubos.
  - G) Indicar la cantidad de controles positivos y negativos a utilizar en la placa.
  - H) Anotar el nombre de la corrida.
- **1.8** Presione *aceptar* para continuar.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 46 de 74	



Figura 3. Menú de configuración para Normalización.

**Nota 3:** El archivo de excel que se ingresa en la aplicación debe tener una columna con los nombres de las muestran, sin incluir un encabezado. Si no ingresa un archivo con el listado de las muestras, puede ingresar las muestras manualmente.

**Nota 4:** El nombre de la corrida mantendrá el siguiente formato: fecha (aaaa/mm/dd), las iniciales del usuario, el ámbito de trabajo (PAT-PEN) y el kit (GF, YF)(no obligatorio). Por ejemplo: 2023OCT17PMVPENGF.

**Nota 5:** El protocolo de amplificación de cada kit trae por defecto la configuración de la concentración final: Y Filer Plus (0,066 ng/uL), Global Filer 29 ciclos (0,066 ng/uL) y NGM Detect 30 ciclos (0,033 ng/uL).

- **1.9** A continuación el programa le mostrará un resumen del volumen requerido de reactivo y de muestra para cada pozo.
- **1.10** Presione *aceptar* para continuar.

## **1.11** Mapa de orden de las muestras y reactivos.

- **1.12** A continuación se muestra la pantalla de Inclusión/Exclusión de Muestras. En esta pantalla se confirma la posición de las muestras y se hace la selección de las muestras a trabajar. Presione *seguir* para continuar. Ver figura 4.
- **1.13** Por defecto, todas las muestras que estén por debajo de 0,005 ng/uL y por encima de 300 ng/uL se verán excluidas. Sin embargo, puede cambiarse la selección de forma manual.
- **1.14** Puede incluir nuevas muestras en este punto, que se indicarán con la observación de "ID No Existe", y serán cargadas con el máximo volumen (15 ng/uL en GF).

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMEDASA	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 47 de 74	

de Concentración		
1 5 9 13 17	21 25 29 33 37	41 45 49 53 57 61 65 69 73 77 81 85 89 93
2 6 10 14 18	22 26 30	42 46 50 54 58 62 66 70 74 78 82 86 90 94
3 / 11 15 19	23 2/ 31 33 39	
4 8 12 16 20	24 28 32	68 72 76 80 84 88 92 96
POS ID CONC OBSERVACIÓN	PRUERA   0.0 no/ul.   D.No existe	lón pos id conc deservación (pos id conc deservación)
2 4921   0.000100000 ng/uL 3 2 47121   83.49210 ng/uL 4 918   0.000500000 ng/uL 5 24521   22.35500 ng/uL	26 27 28 29	2
6 31038   0.286000 ng/ul. 7 2 44221   133.5077 ng/ul. 8 2 45821   27.48860 ng/ul.	30 31 32	
9 2 46421   73.95430 ng/uL 10 47221   8.487000 ng/uL 11 5021   0.0001000000 ng/uL	33 34 35	
12 486/1   13/2884 ng/ul 13 12/20   10/10950 ng/ul 14 5704A   0/03/03/0000 ng/ul 15 46/511   22/04/0 ng/ul	36 37 38 19	
16 2 45121   41,49300 ng/ul. 17 2 45921   39,94330 ng/ul.	40 41 42	
18 26521 ( 11 20910 pa/ul	43 44 45	
18         2 46521         [ 11,20910 ng/vl.           19         2 47321         69,83460 ng/vl.           20         2 47921         1,348300 ng/vl.           21         2 48721         8,600400 ng/vl.	46 47	
18         2 46521         11.2091b ng/ul.           20         2.7921         68346 ng/ul.           20         2.47921         1.348300 ng/ul.           21         2.83721         8.600400 ng/ul.           23         55721         6.00340000 ng/ul.           24         2.44621         52.12333 ng/ul.	48	

Figura 4. Pantalla de inclusión/exclusión de muestras.

**1.15** Luego de seleccionar las muestras a trabajar, deberá seleccionar las posiciones de la placa que serán utilizadas por la escalera alélica (Allelic ladder). Presione *seguir* para continuar. Ver figura 5.

**Nota 6:** El equipo de manera automática permitirá elegir las posiciones de acuerdo a la cantidad de muestras. Se recomienda seguir la recomendación para cada instrumento (ABI3500: un ladder cada 24 muestras o 4 escaleras por placa).

			Ladder										
)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	✓	~	<ul> <li>Image: A set of the set of the</li></ul>									
	8	~	<ul> <li>Image: A second s</li></ul>	<ul> <li>Image: A second s</li></ul>									
	c	~	<ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>										
	D	~	~	<ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>									
	E	~	~										
	F	~	<ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>										
	G	~	~										
	н	~	~										

Figura 5. Pantalla de selección de posición de Allelic Ladder.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMEDASA	P-DCF-ECT-BQM-36			
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 48 de 74		

**1.16** Seguidamente el instrumento indica las posiciones que requiere para llevar a cabo la dilución. En este momento se deben cargar las muestras, placa de PCR, así como la placa o tubos requeridos para diluir. Los tubos de reacción deben estar colocados en su debido soporte. Una vez que se cargue al instrumento lo requerido, presione *sequir* para continuar. Ver figura 6.



Figura 6. Pantalla de carga de deck.

- 1.17 En la siguiente pantalla se realizará el ajuste de la ubicación de las puntas de 50uL.
- 1.18 En esta pantalla puede borrar toda la información de la posición de las puntas con el botón de Remove all. El instrumento recordará las posiciones en que estará sacando las puntas, excepto cuando el protocolo es abortado. Una vez concluido este paso, presione OK para continuar. Ver figura 7.



Figura 7. Pantalla de verificación del número de puntas de 50uL.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 49 de 74

- **1.19** La siguiente pantalla muestra la posición que deben llevar los reactivos en el bloque de reactivos dentro del instrumento. A demás se indica el volumen de master mix que será necesario.
- **1.20** Cargue los reactivos requeridos del kit:

CADENA DE LA POLIMERASA

- A) Master Mix en tubo de 1,5 o 2 ml.
- B) Positivo ADN 007 (tubo kit).
- C) Control Negativo (NEG) en tubo de 1,5 o 2 ml.
- D) Tubos con buffer de dilución (Low TE). Se requieren siempre 4 tubos de buffer de dilución para utilizar los 4 canales al mismo tiempo, aunque el equipo indique menos.

1.21 Presione seguir para continuar. Ver figura 8.

Cargue Reactivos					
HAMILT®N Normalizacion - Cargar Reactivos segun abajo:					
	Clase	Monto	Reactivo	Min Vol (uL)	Obs
	Epp 1.5/2mL Epp 1.5/2mL	4	Diluent Master Mix	479 270	Reaction Mix (uL): 202.5
	Epp 1.5/2mL	1	Pos Ctrl	35	Primers (uL): 67.5
	Epp 1.5/2mL	1	Neg Ctrl	35	
					SEGUIR
$\bigcirc$					

Figura 8. Pantalla de carga de reactivos.

- **1.22** Proceda a la carga de reactivos de acuerdo al esquema presentado por el equipo. Cada bloque debe tener los tubos requeridos. A demás, el programa indica el volumen de MM requerido. Presione *seguir* para continuar.
- **1.23** Verifique que se encuentra la placa de PCR colocada o los tubos de reacción, active el ventilador mediante el botón que se encuentra en la parte delantera y superior izquierda, cierre la puerta para continuar. Presione *empezar* para dar inicio a la corrida. Ver figura 9 y 10.

**Nota 7:** En esta parte es importante revisar que se cuenta con los insumos necesarios y que la placa de PCR o los tubos de reacción se encuentra en posición. El equipo no presenta un sensor de posicionamiento de placa, por lo que si no hay placa en el equipo, igual va a dispensar sobre los bloques.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	T-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 50 de 74



Figura 9. Control de la unidad de ventilación y luz, independiente del instrumento.



Figura 10. Pantalla de inicio de la corrida.

- 1.24 Al finalizar el protocolo observará una pantalla que indica que la corrida finalizó con éxito, presione OK, abra la puerta y selle la placa de amplificación para continuar con la marcha analítica del laboratorio. Ver figura 11.
- **1.25** Retire todos los reactivos y guárdelos adecuadamente.
- **1.26** Apague el ventilador y apague el equipo si es necesario.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 51 de 74



- 1.27 Antes de apagar la computadora, puede extraer el archivo .txt generado por el NIMBUS para ser importado directamente en el equipo 3500. Todos los archivos se guardarán en C: \Program Files (x86)\ HAMILTON\ Methods\ ThermoFisherHID\ Reports\ 3500Setup Files
- **1.28** Para importarlo en el 3500 seleccione *New Plate, Create New Plate from a Standard Format File,* y como método de análisis seleccionar "AB\_HID36\_POP4\_J6\_NT3200".
- **1.29** Continué como se indica en el procedimiento para la amplificación de marcadores genéticos por la reacción en cadena de la polimerasa.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 52 de 74

## Anexo No. 4

CADENA DE LA POLIMERASA

## Guía de uso del Perforador de tarjetas de papel filtro BSD600-ASCENT

- 1. Verifique que el sistema de humidificación se encuentre en condiciones óptimas. Para esto, inspeccione la esponja que se encuentra en la botella ubicada en la parte frontal izquierda del equipo. Desenrosque la tapa de color plateado e introduzca agua destilada desionizada con la ayuda de una pizeta. Humedezca la esponja, pero no la sobrecargue. Coloque la tapa plateada de nuevo en su lugar.
- 2. Encienda la computadora pulsando el botón que se encuentra en el extremo superior derecho de la misma.
- 3. Encienda el equipo pulsando el botón que se encuentra en la parte posterior izquierda.
- 4. Abra el programa pulsando el ícono "BSD Studio". Presione "Start" para iniciar el programa. Usuario: Admin, Clave: admin
- 5. Encienda la bomba de vacío que se encuentra debajo de la mesa de trabajo, pulsando el botón que se encuentra en la parte trasera de la misma.
- 6. En la barra de abajo seleccione "Test Editor" y adicione ("Add") una nueva plantilla si es necesario. Seleccione en "Fill ordering" la opción "Vertical" o lo que sea requerido. Dándole click a cada pocillo puede seleccionar si es muestra o control y la puede rotular. Nota: los pocillos que no requiere marquelos como "Unused".

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO
DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL,
COSTA RICA

## PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

### P-DCF-ECT-BQM-36

PAGINA: 53 de 74

VERSIÓN 16



- 7. En la barra de abajo seleccione "Punch", y seleccione en la parte superior izquierda la plantilla creada y ubiquela en la posición 1 de los platos. En la parte superior izquierda en donde se indica "Deck positions", seleccione "1 Empty".
- 8. En la parte superior derecha aparecerá "SELECTED TEST", busque en el desplegable la plantilla a utilizar para el recorte de muestras. Al seleccionar la plantilla se despliega

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	т-вQМ-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 54 de 74

una imagen de la gradilla con las posiciones a utilizar. Pulse "X" para salir de la pantalla. Habilite las opciones que requiere de muestras, controles, estandares. Selecciones las opciones de limpieza del punch en la opción "Cleaning".



9. Inicie el recorte de muestras pulsando "START PUNCH" ubicado en la parte superior derecha, posteriormente pulse "Continue".

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 55 de 74

**CADENA DE LA POLIMERASA** 

#### BSD600 Ascent A2 ck positions werificacion main ma

10. El programa solicitará una limpieza inicial, por lo que debe colocar una tarjeta sin muestra en el área de perforación. Pulse "Punch" o el pedal.

BSD600 Ascent A2	Admin 7/8	/2022 3:38 PM _ #
Deck positions	ELL CAMERA PUNCH INFORMATION	PUNCH PATTERN
Verification     Empty	Please press the foot switch to punch.	
	WELL FILL ORDER WELL LABEL SAMPLE BARCODE PLATE BARCOD	
		Show plate Images
		Show platernap
	٩	View Log
		Inspect Plates
	CLEANING WELL PUNCH	Sample Info
		Skip Sample
		Cleaning punch
Create Template		Re-punch sample
		C Part

11. Proceda con el recorte de los controles y de las muestras, según se indica en el esquema de la gradilla. Utilice el botón "Punch", el pedal o la opción automática según

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL	VERSIÓN 16	PAGINA: 56 de 74

## MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN **CADENA DE LA POLIMERASA**

lo requiera. Al seleccionar la casilla "Sample Barcode" con doble clic es posible utilizar el lector de código de barras para identificar cada muestra.



- 12. El programa solicitará limpieza entre muestras, por lo que se procederá como en el punto 9.
- 13. En la opción "Show plate images" y "show platemap" puede revisar la correcta ubicación de las muestras.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 57 de 74

# MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



- 14. Cuando finalice el recorte de muestras, pulse "End punch" Y "OK". Si amerita guarde la corrida. Cuidadosamente levante la tapa del equipo, cubra la gradilla con un cobertor y extraiga la misma.
- 15. Apague la bomba de vacío y luego apague el equipo.
- 16. En la barra ubicada en la parte inferior de la pantalla pulse "HOME", salga de la aplicación y apague la computadora.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 58 de 74

## Anexo No. 5

## Guía de uso del Perforador de tarjetas de papel filtro BSD600-DUET

## **1 INICIO DEL INSTRUMENTO**

- **1.1.1** Conecte la bomba de aire que indica Whisper. 60 en su parte inferior, el equipo Perforador BSD600-DUET y la computadora (ver figura 1 y 2).
- **1.1.2** Encienda la bomba de vacío en el botón negro de encendido (ver figura 3).



PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 59 de 74

## 1.2 PROGRAMA

CADENA DE LA POLIMERASA

- **1.2.1** Inicie el programa BSD600-Duet Menu. Ingrese en la opción de usuario la palabra "Administrator" y en la opción clave digite la palabra "admin".
- **1.2.2** Seleccione, en la pantalla que se despliega, el ícono con la opción Distribución de Manchas ("Distribute Spots").
- **1.2.3** Permita que el programa inicie y que se indique en la pantalla que se despliega que el equipo perforador está funcionando correctamente: "The Spot detector is operating co-rrectly" (ver figura 4), y haga clic en continuar ("Continue"). En caso contrario cierre el programa y vuelva a iniciar sesión en el mismo. Si el problema no se corrige proceda a recortar sin utilizar el detector.

S BSD Duet Punch Spots Action About Exit Help The Spot detector is operating correctly Press Continue to start the punch run.	
Action About Exit Help The Spot detector is operating correctly Press Continue to start the punch run.	
The Spot detector is operating correctly Press Continue to start the punch run.           1         S6well Back           3         Back	
PIANO	

**1.2.4** En la pantalla que se despliega, seleccione la opción todas las pruebas disponibles ("All available tests") y haga clic en continuar (opción "Continue") (ver figura 5).

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL,	VERSIÓN 16	PAGINA: 60 de 74

BSD Duet Punch Spots	
Action About Exit Help	
Select test group to punch	
All available tests	
I Séwei Back 3 Back 4 FontLi front	DA
Figura 5. Selección de todas la pruebas dispo	onibles

**1.2.5** En la pantalla que se despliega "Select tests to punch", seleccione la opción 96 hoyos frontal ("96well\_front"), muestras ("Samples") y limpieza ("Cleaning") en los cuadros de opciones y haga clic en continuar (opción "Continue") (ver figura 6).

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMEDASA	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 61 de 74

BSD Duet Punch Spots     Action About Evit Help	
Select tests to punch 95well Back 95well from Back Back Form	✓ Samples ☐ Standards ☐ Controls ✓ Cleaging <u>Continue</u>
1 Soweii Back 3 Back	ROLADA
Figura 6. Selección de	tipo de prueba a utilizar

**1.2.6** En la pantalla que se despliega, bajo la opción "Scan plate barcode for ..." asigne un nombre a la corrida y haga clic en "Continue with manually entered barcode" (ver figura 7).

🗿 BSD Duet	Punch Spots		~				
Action About	Exit Help						
Scan pl Please scan the	late barcode i e barcode on your new plate	for Front plate					
pater o	penal-fecha(di	a-mes-ano)-inic	iales de usuario	·			
		<u>c</u> <u>v</u>			<u>Continue</u> with manually entered barcode		
		U					
				2 Cleani	ing		
	1. Front						
		F	igura 7. Int	roducción	del nombre de la pl	аса	

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 62 de 74

**1.2.7** En la pantalla que se despliega, en la opción número inicial de muestra ("Starting sample number") deje el número 1 y haga clic en continuar (opción "Continue") (ver figura 8).



**1.2.8** Cuando se despliega la siguiente pantalla, carga de placa ("Load tray", ver figura 9), abra la tapa de plástico transparente del Perforador BSD600-DUET y coloque una placa nueva de 96 hoyos en la base FRONTAL de la plataforma del Perforador BSD600-DUET. En la pantalla que se desplegó haga clic en continuar (opción "Continue") (ver figura 10).

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 63 de 74



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 64 de 74
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	

1.2.9 En la pantalla que se despliega se muestra el mensaje "cleaning plate 1" (ver figura 11) el cual indica que se debe colocar el reservorio para descarte de limpieza (ver figura 12). Si este no se encuentra previamente en el equipo colóquelo y haga clic en continuar (opción "Continue") en la pantalla.

🗃 BSD Due	t Punch Spots
Action Abou	t Exit Help
Please load yo	r dy us ray onto the tray table. Press Continue when ready.
Tray	
Barcode	Scan barrode anan Back Daminu
	Figura 11. Carga de tubo para descarte de limpieza

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 65 de 74
PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	



Figura 12. Reservorio para descarte de limpieza en el equipo BSD600-DUET

## 1.3 RECORTE DE LA MUESTRA

1.3.1 En la pantalla que se despliega, dar doble clic en los pocillos en los que desea inhabilitar el recorte de muestra (ver figura 13). El software en ese momento despliega una panta-lla en la que pide confirmar la anulación del pozo seleccionado: "Are you sure you want to make Cell XX unused? This can NOT be undone!", hacer clic en "Yes". Una vez inhabilitado el pocillo deseado, este se torna de color gris en la cuadricula que se muestra en la pantalla (los pozos habilitados para recorte se presentan de un color rosado)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 66 de 74

## CADENA DE LA POLIMERASA



**1.3.2** Posicione el código de barras de la etiqueta de la muestra en el lector de código de barras del equipo BSD600-DUET (ver figura 14), al momento de leer el código, el equipo pita y su plataforma se moverá al pocillo correspondiente. Si no va a utilizar el código de barras de las etiquetas de la muestra, en la pantalla que se desplegó "Scan barcode for sample 1", ingrese la identificación de la muestra manualmente y seleccione continuar ("Continue with manually entered barcode") (ver figura 15).



PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 67 de 74



**1.3.3** Coloque la mancha de sangre de la tarjeta de papel filtro tipo FTA o similar en el sujetador de tarjetas de tal manera que el haz de luz rojo quede dentro del área que se desee recortar (ver figura 16).



PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 68 de 74

**1.3.4** Presione el interruptor de pie (ver figura 17) para que el perforador recorte la muestra y esta caiga en el pocillo correspondiente. Alternativamente puede utilizar la funcionalidad de recorte automático encendiendo el dispositivo "BSD AUTOMATIC PUNCH TRIGGER" mediante su botón "ON/OFF". La perilla de este dispositivo regula el tiempo que tarda en recortarse la muestra una vez que la misma es colocada dentro del sujetador de tarjetas. (Ver nota N.º 1).



**Nota N.º 1**. En caso de que no se recorte el trozo de papel de la tarjeta de papel filtro, se despliega una pantalla que alerta que la muestra no fue recortada y saldrán las siguientes opciones: Tarjeta no Perforada ("Card Not Punched"), Inspeccionar Placa ("Inspect Tray"), Trozo de papel descartado ("Spot Discarded"), Trozo de papel colocado en el hoyo ("Spot Placed in Cell"), Trozo de papel en el hoyo ("Spot in Cell") y Trozo de papel no encontrado ("Spot Not Found"). Seleccione la respuesta o acción correspondiente haciendo clic sobre la opción y vuelva a recortar de ser necesario. De seleccionar las opciones Tarjeta no Perforada, Trozo de papel descartado o Trozo de papel no encontrado, se habilitará el recorte de la muestra nuevamente. De seleccionar las opciones Trozo de papel en el hoyo o Trozo de papel colocado en el hoyo, se continuará con el recorte de las muestras siguientes. De seleccionar la opción Inspeccionar placa, la plataforma se desplaza hacia el frente para revisar la placa.

**1.3.5** Después del recorte de la muestra, el equipo moverá la plataforma interna hasta el reservorio para descarte de limpieza. En la pantalla se colocará un círculo negro alrededor del círculo amarillo que representa este reservorio (ver figura 18). En este momento se debe recortar una zona en blanco de la tarjeta de papel de filtro tipo FTA o similar para limpiar el perforador. El papel recortado caerá en el recipiente de limpieza. El lector de código de barras no se activará hasta que este paso se haya realizado.

COSTA RICA		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO	VERSIÓN 16	PAGINA: 69 de 74

**CADENA DE LA POLIMERASA** 



**1.3.6** Repita los puntos 7.3.3., 7.3.4., 7.3.5. y 7.3.6. para cada muestra. En el esquema de las muestras que se presenta en la pantalla, las muestras recortadas aparecerán en rojo, y los espacios libres por recortar en color rosado. (Ver nota N.º 2. )

**Nota 2.:** Si desea confirmar que el trozo de muestra recortado se haya depositado en el pocillo correspondiente, antes de hacer el paso de limpieza (punto 7.3.6.), haga "clic" en la opción de inspeccionar placa: "Inspect trays" (ver figura 19) que está habilitado en la pantalla. El equipo traerá la placa hacia adelante para que se revisen los pocillos. Una vez revisada la placa (ver figura 20) haga clic en continuar (opción "Continue") para volver a la pantalla de limpieza. Proceda con el paso 7.3.6. En caso de que la muestra no se encuentre en el pocillo, haga doble clic sobre el pocillo correspondiente para volver a recortar.

## MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

### Y



COPIANC

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 71 de 74



1.3.7 Cuando termine de recortar las muestras, coloque el cursor del mouse en el menú superior de la pantalla y haga clic en "Action" y luego en "End Run" para terminar la corrida (ver figura 21). Aparecerá una ventana que indica que se debe retirar la placa y revisar que todas las muestras se encuentran en los pocillos (ver figura 22). Una vez realizada esta revisión, hacer clic en la opción "todas las muestras presentes" ("all spots present") (ver figura 22). Si se presenta el caso de una muestra ausente en un pocillo, esta puede ser recortada de manera manual.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36	
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 72 de 74


PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-ECT-BQM-36		
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 73 de 74	

**1.3.8** Se despliega una pantalla que indica que la corrida ha finalizado "The run is complete". En esta pantalla se habilitan tres opciones: Imprimir el mapa de la placa "Print plate maps", terminar la corrida "End Run" o continuar el recorte "Continue Punching" (ver figura 23).

-					
BSD Duet Punch S	pots				
The run is co Please select one	<sup>™</sup> ••••••••••••••••••••••••••••••••••••				
	Print plate maps		End Run	Continue Punching	
	Swell front)		ROI		
F	- Figura 23. Pantalla de in	presión del mapa	de la placa o fi	nalización de	la corrida
L	-		•		

- **1.3.9** Haga clic en la opción de imprimir el mapa de la placa "Print plate maps". . Imprima en formato pdf el mapa del plato en la carpeta respectiva al año y usuario que está usando el equipo (C:/Escritorio/usuarioX).
- **1.3.10** Salga del programa colocando el cursor en el menú superior y haciendo clic en Salir "Exit" y en Salir "Exit" (ver figura 24) y en la pantalla que se despliega: "are you sure you wish to end this run and exit the BSD Duet Punch spots program" hacer clic en "Yes". Se desplegará la pantalla del escritorio de la computadora.

PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	P-DCF-EC	CT-BQM-36
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA	VERSIÓN 16	PAGINA: 74 de 74

🗿 BSD Duet Punch Spot	ts							
The run Exit Help	<b>nplete</b> the following opti	ons.						
	Print	plate maps				End Run	Continue Punching	
					E Disaning	201	ADA	
Figura 24. Comando para salida del programa								

- **1.3.11** Apague la bomba de vacío y apague el Perforador de Tarjetas de papel de filtro BSD600-DUET. Ver Figuras 2 y 3.
- **1.3.12** Apague la computadora y desconecta la bomba de aire.

-OPIAN'