



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

**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E
INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-BQM-55

Versión: 03

Rige desde: 06/03/2025

PAGINA: 1 de 43

Elaborado o modificado por:

Dra. Anayanci Rodríguez Quesada
Profesional en Genética Forense.
Sección de Genética Forense

Revisado por Líder Técnico:

Dr. Alejandro Hernández Bolaños
Profesional en Genética Forense
Líder Técnico a.i. Sección Genética Forense

Visto Bueno Encargado de Calidad:

Dra. Xinia Barrantes Rodríguez
Profesional en Genética Forense.
Encargado de Calidad a.i. Sección de
Genética Forense

Aprobado por:

Dra. Anayanci Rodríguez Quesada
Jefatura a.i. Sección de Genética Forense



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

**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E
INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-BQM-55

Versión: 03

Rige desde: 06/03/2025

PAGINA: 2 de 43

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	09/10/2019	10/11/2023	Versión inicial del procedimiento	22-2019	EFM
02	10/11/2023	06/03/2025	Revisión y edición de documento	24-2023	ARQ
03	06/03/2025		Cambio de nombre de Sección. Revisión y edición.	10-2025	ARQ

**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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 3 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

1 Objetivo:

El propósito de este PON es establecer la metodología para los análisis por ADN mitocondrial en la Sección de Genética Forense utilizando la metodología de electroforesis capilar.

2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para realizar análisis de ADN mitocondrial de elementos pilosos, sangre, restos óseos y otros tejidos humanos. Mediante este análisis se pretende comparar el haplotipo mitocondrial del ofendido y/o imputado/s con el haplotipo mitocondrial de la(s) muestra(s) cuestionada(s).

Según el PON vigente de análisis de restos óseos, cuando un resto óseo "Desconocido" o "no identificado" no amplifica por ADN nuclear, se debe realizar ADN mitocondrial. el procedimiento que se debe seguir en estos casos es que "Recepción de solicitudes" le asigne un numero nuevo como ampliación de la solicitud que se recibió de patología. El grupo de comparación deberá aportar los extractos de dichas muestras para realizar los análisis de ADN mitocondrial. Tomar en cuenta si existen familiares para realizar la comparación correspondiente.

3 Referencias:

- Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer User Guide. APPLIED BIOSYSTEMS. 2015.
- GeneMapper® ID-X Software. Version 1.5 APPLIED BIOSYSTEMS. 2015.
- ADN mitocondrial: Interpretación y valoración de resultados. Manuel Crespillo Instituto Nacional de Toxicología, Sección de Biología Barcelona (España). Tema 2,5.
- Armed Forces DNA Identification Laboratory. 1995. Extraction of DNA from Dried Skeletal Remains. Washington, D.C.
- Cambridge Sequence Reference (CRS)" Anderson et al. 1981.
- Database Search: SAM2 Huber et [at 2018](#).
- El ADN mitocondrial en Medicina Forense. Fabio Peiró Codina et al. Laboratorio de Genética Forense. Universidad de Zaragoza (España).
- FBI Laboratory. DQσ Typing Protocols. USA. 1992.
- Microcon. Centrifugal Filter Devices. User Guide. Millipore. 2005.
- Base de datos de Genética Forense: <http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>
- Base de datos EMPOP: WWW.empop.online/.
- SeqScape Software User Documents. Sanger sequencing mutation analysis software. Applied biosystems.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- Nomenclature: ISFG recommendations [Parson et al 2014](#).
- Quality Control (QC): Parson and Dür 2007, [Zimmermann et al 2011](#).

4 Equipos y Materiales:

- Agitador magnético con calentador, Corning Stirrer/hot plate o similar.
- Agitador Thermomixer, Eppendorf o similar.
- Agitador tipo vortex.
- Anteojos de seguridad.
- Balanza granataria Mettler Toledo o similar.
- Balón aforado tipo Pyrex de 1 y 2L
- Barra agitadora magnética.
- Beaker de 150mL y 1L.
- Bisturí limpio y estéril.
- Botellas de plástico de 100mL con tapa de rosca tipo Nalgene o similar, estériles.
- Botellas de vidrio ámbar de 1L.
- Botellas de vidrio de 100mL, estériles.
- Botellas de vidrio transparentes de 1L.
- Cajas petri plásticas o vidrio estériles de 100mm X 15mm, nuevas.
- Cámara de electroforesis.
- [Cámara fotográfica o similar](#).
- Cápsulas plásticas desechables para pesar.
- Capilla de extracción de gases.
- Cubreboca (mascarilla).
- Cubrecabeza (gorro)
- Cobertor para gradilla de microtubos de reacción microamp o similar.
- Control positivo (sangre humana conocida en mancha). Ver Anexo Número 3.
- Congelador -20° C.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- Detergente Terg-A-Zyme, Marca Alconox al 5% o similar.
- Espátulas limpias y estériles.
- Erlenmeyer de 1L.
- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Análisis de ADN Mitocondrial.
- Fuente de poder.
- Gabacha desechable.
- Guantes desechables.
- Gradillas para microtubos de reacción microamp o similar.
- Hielera con hielo en escarcha.
- Hoja de bisturí #20 o similar, nuevas estériles.
- Libro de control de equipo Microscopio Olympus CH-2 o similar.
- Libro de control de equipo Centrífuga y Microcentrífuga.
- Marcador con tinta indeleble.
- Micropipeta ajustable de 2 a 20ul.
- Micropipeta ajustable de 20-200uL.
- Micropipeta ajustable de 100-1000uL.
- Microcentrífuga con rango entre 0-14000 r.p.m, o similar.
- Microscopio de luz binocular con lente de inmersión a 100x, Olympus CH-2 o similar.
- Pastillas magnéticas.
- Pinzas de punta curva.
- Pinzas de punta recta.
- Pizeta de 500mL.
- Placas ópticas de 96 hoyos microamp optical o similar.
- Placas de petri 150 mm X 20 mm o similar.
- Placas petri esteriles.
- Peines para cámara de electroforesis.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 6 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- Puntas para micropipeta de 5, 20-200uL nuevas y estériles.
- Porta y cubre objetos nuevos para observación al microscopio, estériles.
- Probetas estériles de 25, 100, 250, 500mL.
- pH metro.
- Reloj de intervalos 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.
- Regla dividida en milímetros.
- Toallas de papel desechables.
- Toallas suaves desechables "Kimwipes", marca Kimberly-Clark o similar.
- Tubos Centricom-YM100 (concentradores) Millipore o similar, nuevos, estériles.
- Tubo cónico de 50mL, estériles.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5mL nuevos y estériles, marca Eppendorf o similar
- Transiluminador UV.

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Acetato de sodio grado reactivo, Sigma o similar.
- Acetato de sodio 0,2 M. Ver Anexo Número 01.
- Acetato de sodio 3 M. Ver Anexo Número 01.
- Ácido acético glacial grado reactivo Sigma o similar.
- Ácido clorhídrico concentrado, grado reactivo, Código H-7020 Sigma o similar.
- Ácido etilén diamino tetracético disódico (EDTA), grado reactivo, Sigma o similar.
- Azul de bromofenol
- Agua de tubo.
- Agua desionizada tipo Milli Q estéril.
- Agua desionizada tipo Milli Q.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 7 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- Etanol absoluto grado reactivo (99,8-100%), J.T. Baker o similar.
- ExoSapIt.
- Buffers de carga para electroforesis Ver Anexo Número 01.
- Buffer de extracción (SEB) 10 mM Tris- 100 mM NaCl- 39 mM DTT- 10 mM EDTA- 2 %. SDS, ver anexo Número 01.
- Buffer TE -4. Ver Anexo Número 01.
- [Cintas o etiquetas autoadhesivas para rotular.](#)
- Cloruro de sodio grado reactivo, Sigma o similar.
- Detergente Alconox o similar.
- Detergente Alconox al 5% solución. Ver Anexo Número 01.
- Descontaminante de ADN ARNnasa, DNA Away o similar.
- Ditioneitol (DTT) grado reactivo, Sigma o similar.
- DNA Quantification Ladder Origene o similar.
- EDTA 0,5 M pH 8. Ver Anexo No.1.
- Etanol de 70 % grado comercial.
- Formamida.
- Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamil (25:24:1), Sigma o similar.
- Gel Red nucleic acid Gel Stain Sigma o similar.
- Glicerol.
- Hidróxido de sodio, grado reactivo, Merck o similar.
- Hielo en escarcha.
- Mezcla DTT-SEB. Ver Anexo No. 1.
- Primers o imprimadores para ADN mitocondrial:
 - A1 (L 15997) 5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3 '
 - B2 (H 16237) 5'-GGC TTT GGA GTT GCA GTT GAT-3 '
 - A2 (L 16159) 5'-TAC TTG ACC ACC TGT AGT AC-3 '

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 8 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- B1 (H 16391) 5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC-3 '
- A4 * (L 16209) 5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3 '
- B4 * (H 16164) 5'-TTT GAT GTG GAT TGG GTT T-3 '
- C1 (L 048) 5'-CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC-3 '
- D2 (H 285) 5'-GGG GTT TGG TGG AAA TTT TTT G-3 '
- C2 (L 177) 5'-TTA TTT ATC GCA CCT ACG TTC AAT-3 '
- D1 (H 409) 5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC-3 '
- Proteinasa K (PK), Sigma o similar. Ver Anexo No. 1.
- Sodio Dodecil Sulfato (SDS) de grado biología molecular, Sigma o similar.
- Solución de SDS al 10% y al 20%. Ver Anexo Número 01.
- Tris-Base, grado Biología Molecular, Sigma o similar.
- Tris-HCl 1 M (pH 8.0) pH8. Ver Anexo No. 1.
- 8-hidroxiquinolina (HQL) grado biología molecular, Sigma o similar.
- Xilol.

6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento de extracción debe realizarse en las áreas asignadas para este propósito en la Sección de Genética Forense.

7 Procedimiento:

7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE ELEMENTOS PILOSOS.

Nota 1: Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento para el Análisis de ADN Mitocondrial: Sección de Genética Forense como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

Nota 2: Para todo el procedimiento, utilice cubrecabeza, cubreboca, gabacha desechable (blanca pre-amplificación y celeste post-amplificación) y guantes desechables.

Nota 3: Solo se trabajan elementos pilosos de al menos 2 cm de longitud y que cuenten con resultado de "no descarte" o "inconcluso" en el análisis morfológico comparativo previamente realizado por la Sección de Biología. Si las muestras son elementos pilosos fijados (EP) en resina en porta-cubre objetos, se deberá realizar el desmontaje (separación), ver punto 7.1.1. De lo contrario pase a la etapa de lavado del EP, ver punto 7.1.2.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Nota 4: Si las muestras son sangre u otras (que no ocupan desmontaje ni lavado) pase a la etapa de Digestión-extracción de ADN, ver punto 7.1.3

7.1.1 DESMONTAJE DE ELEMENTOS PILOSOS.

- 7.1.1.1** Limpie la mesa de trabajo con papel toalla y etanol al 70% y/o DNA Away.
- 7.1.1.2** Revise al microscopio la lámina donde viene fijado el EP y registre la presencia/ausencia de raíz del elemento piloso. Ver anexo 04
- 7.1.1.3** Coloque la lamina de vidrio con el EP a una temperatura aproximada de $\pm -20^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1:30hrs.
- 7.1.1.4** En una cámara de flujo laminar, sumerja la lámina con el EP, en una caja de petri de vidrio con xilol, por aproximadamente 15 min, esto para deshacer la resina,
- 7.1.1.4.1** Separe el cubreobjetos de la lámina utilizando una pinza y bisturí y separe por completo el EP.
- 7.1.1.5** Coloque el EP en un tubo de 1.5ml rotulado con el número de OT y el nombre de la muestra, para ello utilice una pinza
- 7.1.1.5.1** Agregue xilol limpio para eliminar residuos de resina/vidrio.
- 7.1.1.6** Coloque el EP en papel kimwipes o similar dentro de una placa de petri rotulada con el número de OT y el nombre de muestra y deje secar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente para evaporar el xilol.
- 7.1.1.7** El EP esta listo para la etapa de lavado.

7.1.2 ETAPA DE LAVADO DEL EP.

- 7.1.2.1** Limpie la mesa de trabajo con papel toalla etanol al 70% y/o DNA Away.
- 7.1.2.2** Coloque papel toalla desechable sobre la superficie de trabajo para cada EP
- 7.1.2.3** Coloque el EP sobre papel kimwipes o similar e identifique con el número de orden de trabajo (OT) y nombre de la muestra.
- 7.1.2.4** Corte aproximadamente entre 2-4cm del EP, utilizando una hoja de bisturí estéril, desde la parte proximal (raíz) y coloque en un tubo de 1,5ml rotulado con el numero de OT y nombre de la muestra. Ver anexo 4.
- 7.1.2.5** Agregue 400ul de acetato de sodio 0,2M, 35ul de SDS 10% y 30ul de PK (20 mg/ml).
- 7.1.2.6** Coloque los tubos en el thermomixer a 56°C por aproximadamente de 1:30 a 2:00hrs en agitación a 600-1000rpm.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 10 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.1.2.7 Retire el o los tubos del thermomixer y coloque el EP en otro tubo 1.5ml nuevo rotulado con el número de OT y nombre de la muestra y agregue 1ml de buffer TE-4 para enjuagarlo.

7.1.2.8 Agite manualmente para enjuagar el EP.

7.1.2.9 Retire el EP con pinza limpia y coloque en papel kimwipes o similar y proceda a cortarlo en trocitos de aproximadamente 0,5cm utilizando una hoja de bisturí estéril y coloque los trozos en otro tubo de 1.5ml nuevo rotulado con el número de OT y la identificación de la muestra.

7.1.3 ETAPA DE DIGESTION-EXTRACCION DEL ADN.

Nota 5: A partir de este paso se deben agregar al procedimiento un control positivo de extracción (CPE) y un control negativo de extracción (CNE).

7.1.3.1 Agregue 400ul de buffer de extracción SEB con DTT fresco (ver anexo 1) a cada muestra (EP, sangre, etc) y controles.

7.1.3.2 Agregue 35ul de SDS y 30ul de PK (20mg/ml) a cada muestra y controles.

7.1.3.3 Coloque los tubos en el thermomixer a 56°C durante toda la noche en agitación a 600-1000rpm.

7.1.3.4 Al menos 12hrs después se deberá visualizar si la totalidad del EP fue digerido.

7.1.3.4.1 Si no sucedió la digestión completa del EP (se observan restos traslucidos de EP en el tubo), agregue de 4-10ul de PK y de 5-10 ul DTT y coloque nuevamente en el thermomixer por apropiadamente de 1 a 4hrs o hasta que se complete la digestión del EP.

7.1.4 ETAPA DE LIMPIEZA Y CONCENTRACION DEL ADN.

7.1.4.1 Agregue 400µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo 25:24:1v/v a cada tubo (el reactivo debe estar a temperatura ambiente). Este paso se debe realizar en la capilla de extracción de gases.

7.1.4.2 Agite los tubos en vortex de 25-30seg hasta obtener una apariencia lechosa.

7.1.4.3 Centrifugue los tubos a 14000rpm durante 5 minutos.

7.1.4.4 Utilizando una micropipeta, transfiera el sobrenadante de cada tubo a una columna con filtro microcon YM-100 previamente rotulada con el número de OT y nombre de la muestra. Se debe tener cuidado de no transferir la capa fenólica a la columna. (Ver Anexo 2).

7.1.4.5 Centrifugue todos los filtros microcon aproximadamente de 20 a 30min a 500xg.

7.1.4.5.1 Se debe evitar que el filtro se seque demasiado en la etapa de centrifugación.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 11 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- 7.1.4.6** Agregue 400uL de agua desionizada Tipo MilliQ estéril o similar a cada tubo microcon.
- 7.1.4.7** Centrifugue aproximadamente de 20 a 30min por 500xg.
- 7.1.4.8** Repita el paso (7.1.4.6 y 7.1.4.7) 3 veces más desechando el filtrado entre cada lavado.
- 7.1.4.9** En el último lavado se debe recuperar el ADN retenido en el filtro.
- 7.1.4.10** Saque el filtro del tubo y colóquelo invertido en otro tubo nuevo, previamente rotulado con el numero de OT y el nombre de la muestra.
- 7.1.4.11** Centrifugue por apropiadamente 5 min a 1000xg. Se debe obtener un volumen ideal de aproximadamente 50-70ul.
- 7.1.4.12** Traslade todos los extractos provenientes de/los EP al encargado del proceso de cuantificación en tiempo real.
- 7.1.4.13** Si el resultado de la cuantificación permite amplificar al menos 0,125ng de ADN nuclear (ADNnu)(límite de detección establecido en la validación de la prueba), proceda a trasladar los extractos al analista correspondiente para el montaje de marcadores genéticos autosómicos.
- 7.1.4.14** Si el resultado de la cuantificación no permite amplificar al menos 0,125ng de ADNnu, proceda a realizar el análisis por ADN mitocondrial (ADNMit).
- 7.1.4.15** En caso necesario almacene los extractos a +/- -20 °C o proceda a realizar el proceso de amplificación/secuenciación.

7.2 AMPLIFICACION Y SECUENCIACIÓN DE ADNmt.

7.2.1 MONTAJE DE PCR DE AMPLIFICACIÓN ADNmt.

Nota 6: Verifique que antes de comenzar a trabajar, disponga de suficiente material limpio y autoclavado (puntas, tubos para PCR, gradillas, cobertor, etc).

7.2.1.1 Utilice guantes desechables, cubreboca, cubrecabezas y gabacha desechable de color blanco.

7.2.1.1.1 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 o secuenciación.

Nota 7: Las gabachas que se utilizan en la zona de pre amplificación son de color blanco y son diferentes a las utilizadas en la zona de post amplificación(electroforesis) que son color celeste. Esto evita posibles contaminaciones entre áreas. En caso ÚNICO de no contar con gabachas desechables, se utilizaran gabachas limpias debidamente rotuladas.

7.2.1.2 Limpie con DNA Away o similar y/o etanol de 70% la cámara de PCR o de flujo laminar que se va a utilizar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 12 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- 7.2.1.3** Limpie las micropipetas que se van a utilizar con DNA Away o similar y/o etanol de 70% e introducírlas a la cámara estéril o de flujo laminar.
- 7.2.1.4** Coloque todo el material a utilizar (puntas, cobertores de placas, placas, tubos de PCR, gradillas y pipetas) dentro de la cámara de bioseguridad.
- 7.2.1.5** Irradie todo el material dentro de la cámara de PCR o de flujo laminar con luz ultravioleta por al menos 15 minutos.
- 7.2.1.6** Limpie la mesa de trabajo de los cuartos de montaje de PCR con DNA Away o similar y/o etanol de 70% cada vez que va a hacer un montaje.

Nota 8: El material utilizado en el proceso de amplificación como puntas, tubos de reacción, etc, 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 para material bioinfeccioso. Nunca lleve material amplificado a la zona de pre-amplificación como es el área de extracción de ADN o montaje de PCR.

7.2.1.7 Los controles que se deben montar cada vez que se realice una amplificación son:

-Control positivo de extracción y amplificación): control de extracto con haplotipo conocido. Generalmente es una muestra de sangre.

-Control negativo de PCR (de amplificación): es un control que lleva todos los reactivos de la amplificación excepto la muestra de ADN.

-Control positivo de amplificación (DNA 007): control comercial

-Control negativo de extracción: es un tubo de 1,5mL que se incluye cuando se realiza la extracción de las muestras y que contiene solamente los reactivos que se usaron en dicha extracción.

7.2.1.8 Descongele, de ser necesario, los reactivos y manténgalos en hielo escarchado.

7.2.1.9 Homogenice, con agitador tipo vortex o similar, los reactivos manteniendo en todo momento la mezcla de reacción sobre hielo.

7.2.1.10 Determine el número de muestras que se van a amplificar.

7.2.1.10.1 Incluya los controles de amplificación que correspondan. (Ver punto 7.2.1.5).

7.2.1.10.2 Sume 1 ó 2 reacciones a este número para compensar la pérdida de volumen por el error de pipeteo.

7.2.1.10.3 Ese será el número total de reacciones y asegura el contar con suficiente mezcla de reacción para todas las muestras.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 13 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.2.1.11 Preparare la mezcla de reacción en un tubo de microcentrifuga estéril nuevo de 1,5mL o de 0,5mL dependiendo del volumen a preparar, de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 1. Volúmenes de reactivos para amplificación de ADNMit.

ADN Mitocondrial	
Reactivo	Vol. por muestra (µL)
Agua desionizada tipo Milli Q, estéril	*
Buffer STR Gold 10X	2,5
Primer L (5 µM)	1
Primer H (5 µM)	1
Taq Polimerasa (5 unidades/µL)	0,8
ADN	4-12 µL (2ng)

* El vol. del agua debe completar el vol. final de la reacción, igual a 25 µL.

7.2.1.12 Para amplificar la región de interés utilice los siguientes pares de primers:

Para la región HV1: A1+B1

Para la región HV1A: A1+B2.

Para la región HV1B: A2 y B1.

Si la secuencia cae en el homopolímero: utilice los primers A4+B4

Para la región HV2: C1+D1.

Para la región HV2A: C1+D2.

Para la región HV2B: C2+D1.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 14 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Tabla 2. Primers de amplificación de ADNMit.

Región HV1:	Región HV2
A1,L 15997	C1,L 048
B4,H 16164	D2,H 285
B2,H 16237	C2,L 177
A2,L 16159	D1,H 408
A4,L 16209	-
B1,H 16391	-

7.2.1.13 Coloque en un tubo de reacción de 0,2µL nuevo y autoclavado por cada reacción en la gradilla y soporte correspondiente o bien utilice un pozo de las placas ópticas MicroAmp de 96 pozos (Applied Biosystems) por cada reacción, siguiendo el sucesivo esquema de montaje.

Esquema de montaje de muestras:

Primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 1. Esquema de montaje de muestras para amplificación de ADNMit

7.2.1.14 Agregue el volumen correspondiente de la mezcla de reacción, a cada tubo de reacción de la gradilla y a los controles preparados en el punto 7.2.1.8.

7.2.1.14.1 De último agregue el ADN correspondiente.

7.2.1.15 Coloque el cobertor sobre la gradilla de tubos de 0,2ul o placa óptica y rotule con un marcador de tinta indeleble, la base de tubos de 0,2 ml o la placa óptica con la siguiente información: iniciales de analista y fecha. Si se rotula la base de la placa se debe utilizar un trozo de cinta o una etiqueta adhesiva.

7.2.1.16 Limpie, utilizando papel toalla desechable y absorbente las mesas de trabajo, cámaras de flujo laminar, micropipeteadores y todas las áreas de trabajo con DNA Away o similar y/o etanol de 70%. Ver Procedimiento para Limpieza, Revisión, Control de Acceso y Descontaminación de Áreas del Laboratorio de Análisis de ADN.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 15 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.2.1.17 Trasládese al área de Post-amplificación, con la gradilla de reacción de PCR preparada, manteniéndola en hielo (recipiente o bolsa desechable)

Nota 9: Para el manejo de los termocicladores ver Procedimiento para el uso y manejo del Termociclador ProFlex.

7.2.1.18 Seleccione el programa correspondiente (ver tabla), iniciar el programa y una vez alcanzada una temperatura de al menos 80° C colocar la gradilla en el termociclador y cerrar la cubierta. El programa de 30 ciclos debe utilizarse para elementos pilosos (escaso ADN) y el de 28 ciclos para muestras de referencia.

Tabla 3. Programa de ciclado de ADNMit

ADN Mitocondrial		
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos
95°C/3 min	Hold	1
95°C/1 min	Ciclos	28/32
55°C/1 min		
72°C/1 min		
72°C/7 min	Hold	1
4°C	Hold	1

7.2.1.19 Luego de la amplificación, almacene la gradilla a -20° C hasta que se realice la cuantificación de ADN por medio de gel de agarosa.

7.2.1.19.1 Almacene este amplificado en el área de post-amplificación exclusivamente.

7.2.2 CUANTIFICACIÓN DE ADNMit (GEL DE AGAROSA)

Nota 10: Este proceso se realiza para el estudio de ADN mitocondrial y confirmar la amplificación de ADN, tanto en las muestras como en los controles. En caso de ADN nuclear la cuantificación se realiza mediante el PCR Tiempo Real y se realiza antes de realizar el procedimiento de amplificación de ADNMit. (Ver Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real).

7.2.2.1 Preparación del gel de agarosa al 1% en buffer TBE al 0,5X con colorante Gel Red:

7.2.2.1.1 Pese 0,43 g de agarosa.

7.2.2.1.2 Agregue la agarosa a un erlenmeyer de 125 ml

7.2.2.1.3 Agregue 43 ml de Buffer TBE 0,5X al erlenmeyer de 125 ml.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.2.2.1.4 Caliente y agite con pastilla magnética hasta que se disuelva la agarosa completamente.

7.2.2.1.5 Agregue 1,5 ul de Gel Red.

7.2.2.2 Coloque la base donde se chorreará el gel, dentro de la cámara de electroforesis horizontal, en la posición donde queden los lados descubiertos contra la pared. Colocar uno o dos peines de acuerdo a la cantidad de muestras.

7.2.2.3 Vierta, lentamente, la agarosa disuelta, con el fin de no ocasionar burbujas, coloque los peines y espere por un mínimo de 30 minutos a que la agarosa solidifique. Lave inmediatamente el erlenmeyer utilizado con abundante agua de tubo.

7.2.2.4 Retire los peines del gel preparado e introduzca en la cámara de electroforesis, agregue buffer TBE al 0,5X en una cantidad suficiente que permita cubrir el gel aproximadamente a 0,5cm de su altura.

7.2.2.5 Elabore un esquema de montaje de las muestras y controles según la ubicación que tendrán en los pozos del gel, como se observa en las siguientes figuras:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HV1										
[ADN]										
HV2										
[ADN]										

Figura 2. Esquema de montaje de cuantificación en gel de agarosa.

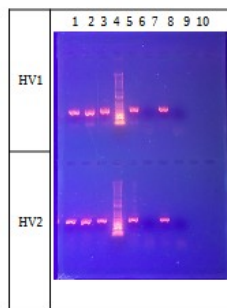


Figura 3: Cuantificación de ADNMit en gel de agarosa.

7.2.2.6 Preparare una dilución, para cada una de las muestras y controles, mezclando 2µL de buffer de corrida con 5µL del producto amplificado. Tome en cuenta que se debe colocar al menos una escalera de peso molecular para cuantificación de ADN.

7.2.2.7 Coloque 5 µL de cada una de las diluciones (punto 7.2.2.6) de las muestras y controles en el pozo correspondiente y escalera, según esquema (punto 7.2.2.5, Figura 2).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 17 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.2.2.8 Conecte los electrodos a la fuente de poder y encienda la fuente de poder (presione el botón de encendido).

7.2.2.8.1 Programe la corrida utilizando 100 voltios por un tiempo aproximado de 30-50 minutos.

7.2.2.9 Una vez finalizado el tiempo de corrida apague la fuente de poder y desconecte los electrodos de la cámara.

7.2.2.10 Coloque el gel en el transiluminador y coloque la tapa correspondiente para protegerse contra los rayos U.V.

7.2.2.11 Encienda el transiluminador y realice la lectura comparando la intensidad de la banda presente en cada una de las muestras con las diferentes intensidades que muestra la escalera de cuantificación de ADN.

7.2.2.12 Anote el resultado (ng/ul de la banda) en el esquema correspondiente.

Nota 11: Si en el gel se visualiza la presencia de 2 o mas bandas de ADN, se considera como resultado ADN insuficiente o degradado, por lo tanto, no se continua con el proceso de secuenciación y se reporta en el dictamen como resultado: ADN insuficiente. Ver ejemplo en la figura 4.

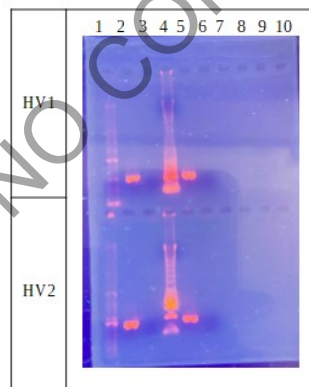


Figura 4. Línea 1 muestra la presencia de varias bandas de ADN

7.2.3 LIMPIEZA DEL PRODUCTO DE PCR.

7.2.3.1 Agregue 2ul de reactivo ExoSap-it o similar por cada 5ul de producto PCR amplificado a cada tubo con material amplificado.

7.2.3.2 Coloque los tubos o placa en un termociclador e inicie el programa de limpieza ExoSap-it correspondiente.

7.2.3.3 El producto de PCR purificado, esta listo para proceder con el montaje de la reacción de secuenciación. En caso de no continuar con el procesa, esta placa se debe almacenar a una temperatura de aproximadamente -20°C.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 18 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

7.2.4 PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN (*Big Dye Terminator*).

Nota 12: El montaje de esta reacción de secuenciación (mezcla de reactivos) debe prepararse en el área de pre-amplificación. El ADN amplificado debe incorporarse luego en el área de Post-amplificación.

7.2.4.1 Calcule la cantidad de reactivos a utilizar por reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Volúmenes de reactivos para amplificación de ADNMit.

ADN Mitocondrial	
Reactivo	Vol. por muestra (µL)
Agua desionizada tipo Milli Q, estéril	*
Big Dye V1,1	4/8
*Primer (1,6 µM) una dirección	2
Buffer dilucion 5X	0/2
ADN**	1-2µL (2ng)

*El vol. del agua debe completar el vol. final de la reacción igual a 20 µL.

** El ADN (respectivo) debe ser agregado en el área de post-amplificación.

Nota 13: Se requiere montar una reacción para cada dirección (forward y reverse) en tubos separados de cada pareja de primers utilizados en la amplificación.

Nota 14: Una vez preparada la placa de secuenciación, esta debe desplazarse al área de post-amplificación en un recipiente o bolsa desechable con hielo, para agregar el ADN correspondiente, desde el producto de PCR purificado.

Nota 15: Para el manejo de los termocicladores ver Procedimiento para el uso y manejo de Termociclador Proflex.

7.2.4.2 Coloque la placa de secuenciación en el termociclador y amplifique utilizando el siguiente protocolo:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 19 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Tabla 5. Programa de secuenciación de ADNMit

ADN Mitocondrial		
Temperatura/tiempo	Método	Ciclos
96°C/1 min	Hold	1
91°C/10 seg	Ciclos	26
50°C/ 5 seg		
60 °C/4 min		
4 °C	Hold	1

7.2.5 LIMPIEZA PRODUCTO DE SECUENCIACION

7.2.5.1 Purificación con Kit X-Terminator

7.2.5.1.1 Agregue en una placa de 96 pozos de 0.5-10 ul del producto de secuenciado, siguiendo el mismo esquema de montaje de la reacción de secuenciación.

7.2.5.1.2 Mezcle 22,5 ul del reactivo SAM y 5 ul de reactivo X-Terminator para cada reacción.

7.2.5.1.3 Agregue a cada muestra 27,5ul de la mezcla preparada en el punto anterior.

7.2.5.1.4 Selle la placa con film adhesivo.

7.2.5.1.5 Coloque la placa en el thermomixer a 2000 rpm por aproximadamente 30-50 minutos.

7.2.5.1.6 Centrifugue la placa a 1000 xg/2 minutos.

7.2.5.1.7 Tome el sobrenadante 10 ul de cada muestra y la colocó en otra placa de 96 pozos.

7.2.5.2 Proceda a realizar la electroforesis capilar en el Analizador Genético respectivo.

7.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Nota 16: Realice la comparación de los Haplotipos para ambas direcciones (forward y reverse) de las regiones completas (HV1 y HV2) con respecto a la secuencia de referencia "Cambridge Sequence Reference (rCRS)" Anderson et al. 1981, aceptada y utilizada a escala mundial en el campo de la identificación forense. Anote las discrepancias encontradas

Nota 17: Esta pericia permite excluir a un individuo falsamente acusado, y en casos de coincidencia no es individualizante, debido a que los haplotipos son compartidos por miembros de la misma línea materna y en menor grado al azar en la población en individuos no emparentados entre si.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 20 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- 7.3.1.1** Una vez obtenido los resultados (archivos datos crudos generados por el analizador genético), deben ser analizados con el programa SeqScape v2.1 o superior, disponible en la Sección de Genética Forense.
- 7.3.1.2** Analice los datos crudos generadas por el analizador genético, para cada región (HV1 y HV2) incorporando las corridas de los primers de ambas direcciones, esto en el programa de análisis SeqScape.
- 7.3.1.2.1** Inicie con el análisis de los controles positivos (CPE y CNE) para validar la corrida.
- 7.3.1.3** Si al analizar el resultado del haplotipo de las muestras, no se obtuvo resultados para la región completa, debe re-secuenciar con los mismos primers y/o otros primers que permitan secuenciar fragmentos mas pequeños de la region HV1 o HV2, lo anterior con el fin de obtener la mayor información posible para cada una de las regiones.
- 7.3.1.3.1** De sospechar del fenómeno de "heteroplasma", se debe valorar y analizar otro tejido del mismo individuo. En caso de que este fenómeno aparezca al analizar elementos pilosos, se deben analizar aproximadamente 5 EP de diferentes zonas de la cabeza del donador.
- 7.3.1.4** Todas las lecturas de los electroferogramas generados en el programa SeqScape, deben ser verificados por un segundo analista competente, lo anterior con el fin de confirmar el haplotipo resultante. Como registro de este análisis se debe completar el Formulario "Estudio de haplotipos (ADN Mitocondrial)" el cual debe ser firmado por ambos analistas (responsable y verificador)

7.3.1.5 Los resultados se deben reportar de la siguiente manera:

SITUACIÓN	INTERPRETACIÓN
Secuencias idénticas	No exclusión
Heteroplasma en mismo nucleótido en ambas	No exclusión
Un nucleótido de diferencia sin evidencia de heteroplasma	No concluyente
Dos o más nucleótidos de diferencia sin evidencia de heteroplasma	Exclusión

7.3.1.6 En caso de No exclusión, se determinará la frecuencia del haplotipo (Counting method) en relación con la bases de datos de la población de Costa Rica (ver anexo No.05) y población hispana para Centro América) referida en la Base de datos de frecuencias Haplotípicas de ADN Mitocondrial EMPOD (ver anexo No.06) y/o se determinará el valor de Likelihood ratio (razón de verosimilitud) LR (ver anexo 07)

Nota 18: La interpretación de haplotipos mezcla de ADNmt, no se realiza ya que este tipo de análisis no es adecuado para distinguir mezclas. La determinación de perfiles con mezclas de ADNmt es considerado una práctica sumamente arriesgada, especialmente cuando existen desbalances significativos entre los componentes de dicha mezcla.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 21 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

Los controles negativos "CN" no debe presentar ninguna banda de amplificación de ADN, mientras que los controles positivos "CP" si debe presentar una banda de amplificación.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

En el dictamen pericial se debe colocar lo siguiente:

RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

NO AMPLIFICA: Los extractos preparados a partir del indicio descrito, no contienen la cantidad mínima necesaria de ADN para lograr la amplificación del haplotipo mitocondrial, debido a la escasa cantidad y/o degradación del material genético. Por lo que debe considerarse como negativo para efectos de esta investigación.

EXCLUSION: El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", es distinto al haplotipo de "xxx" (se requiere que como minimo se presenten dos diferencias entre las secuencias obtenidas). Por lo tanto, se pueden excluir que dicha "muestra x" proceda de dicha persona o de algún familiar que comparta la línea materna.

NO CONCLUYENTE: El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", difiere en solo en una posición con respecto al haplotipo de "xxx" (sin evidencia de heteroplasmia). Por lo tanto, no se puede incluir ni excluir que dicha "muestra x" proceda de "xx" o de algún familiar que comparta la línea materna.

NO EXCLUSION: El haplotipo del ADN mitocondrial de la "Muestra x", coincide con el haplotipo de "xxxx" en todas sus posiciones. Por lo tanto, no se puede excluir que dicha procedan de "xxx", o de algún familiar que comparta la línea materna.

Consultada la base de datos de ADN mitocondrial de la población costarricense se encontró que xx de las xxx personas que componen esa base de datos presenta el mismo perfil de la muestra reseñada como CASO XX. Ver anexo

Consultada la base de datos de ADN mitocondrial de EMPOP se encontró que xx de las xx personas de origen hispano (Centro America) que componen esa base de datos presenta el mismo perfil de la muestra reseñada como CASO XX. Ver anexo

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Todo material biológico es fuente potencial de patógenos.
- Utilizar siempre mascarilla, anteojos y guantes al manipular reactivos
- Descarte apropiadamente los material punzocortante.
- Descarte los desechos orgánicos en envases apropiados y rotulados

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 22 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

12 Simbología:

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- CPE: Control Positivo extracto.
- CNE: Control negativo extracto
- CN PCR: Control negativo de PCR
- CP PCR: AmpF!STR™ DNA Control 007 (human male genomic DNA) o similar
- CN SEC: Control negativo de Big Dye Terminator
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses.
- EP: Elemento piloso.
- N/A: No aplica.
- LOM: Lamina de vidrio Porta-cubre objetos para la observación al microscopio.
- OT: Orden de trabajo
- PK: Proteinasa K.
- PON: Procedimiento de Operación Normado.
- RPM: Revoluciones por minuto.
- SCD: Solicitud de Cambio Documental.
- SDS: Sodio Duodecil Sulfato.
- SEB: Amortiguador sales EDTA .
- SGC: Sistema de Gestión de la Calidad.
- UGC: Unidad de Gestión de la Calidad.
- UGF: Unidad de Genética Forense
- XG: Gravedades

13 Terminología:

- CNE: Consiste de un tubo de 1,5 mL, al que se agregan todos los reactivos salvo la muestra biológica a extraer y se somete a los mismos procesos de la muestra.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 23 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

- CPE: consiste de un tubo de 1,5 mL y al que se le agrega una muestra (ADN conocido) que amplifique para asegurarse que las condiciones de las reacciones fueron las adecuadas.
- Heteroplasmia: Diferentes tipos de ADN en el mismo organismo

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos
02	Diagrama de ensamble del Tubo Centricon
03	Preparación de controles
04	Tipos de raíz de elemento piloso
05	Almacenamiento y búsqueda en bases de datos mitocondrial mtDNAManager-V1
06	PON Consulta base datos mitocondrial (EMPOP) V1
07	Coefficiente de Verosimilitud mitocondrial

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 24 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 01 Preparación de reactivos

Acetato de sodio 3 M

En un beaker de vidrio de 150ml disuelva 13,6 gramos de acetado de sodio en 80mL de agua desionizada tipo Milli Q. El pH se ajusta (pH 8) agregando ácido acético glacial, mida con pHmetro. Ajuste el volumen final a 100mL y trasvase a una botella de vidrio de 100mL. Esterilice por autoclavado. Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio)

Acetato de sodio 0,2M

En un tubo cónico de 50 mL o similar mezcle en una proporción 1:15, solución preparada 3M con agua desionizada tipo Milli Q.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio).

Buffers de carga para electroforesis

Prepare Buffer de Azul de Bromofeno (migración nominal 300bp)

25mg de azul de Bromofenol, 30ml de Glicerol y afora a 10ml con agua desionizada tipo Milli Q.

Almacene a temperatura ambiente hasta 8°C

Buffer TE-4 (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 (1L).

Mida con una probeta de 25mL, 10mL de la solución 1M Tris-HCl (pH 8,0), y con una pipeta de vidrio de 1mL, 0,2mL de la solución de 0,5M EDTA. Agregue lo anterior a un balón aforado con 990mL de agua desionizada tipo Milli Q y lleve a su aforo.

Autoclave la solución y almacene a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio transparente.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio).

Buffer de extracción SEB preparación fresca con DTT

En una capsula desechable, pese 0,004gr/400ul SEB preparado. Este reactivo se debe prepararse cada vez que se utilice.

EDTA 0,5 M pH 8

Para 1L agregue 186,10g de la sal disódica del EDTA a 800mL de agua desionizada tipo Milli Q en un balón aforado. Agite vigorosamente con una barra magnética. Ajuste el pH 8 (use el pH metro) agregando perlas de NaOH (aprox. 20,00g).

Nota 17: El EDTA no se disuelve hasta que se ajuste el pH. Ajuste el volumen a 1L con agua desionizada tipo Milli Q. Trasvase a botella de vidrio transparente.

Esterilice por autoclavado.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio)

Preparación del Buffer de extracción SEB: *

En un beaker de 1L disolver 5,84g de NaCl en 500mL de agua desionizada tipo Milli Q.

Pase esta solución a un balón aforado de un litro y agregue 10mL de Tri-HCL 1M, 20mL de EDTA 0,5M y 100mL de SDS al 20%. Mantener a pH 8 con HCl concentrado (use el pH metro).

Lleve el volumen final con agua desionizada tipo Milli Q y estéril a la marca del balón aforado para ajustar un litro.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 25 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Preparación de Jabón Alconox:

Solución al 5 %.

Pese 5,00gr de Alconox y disolver en 100mL de agua desionizada tipo Milli Q.

Almacene en botellas de plástico o vidrio de 100mL con tapa de rosca tipo Nalgene o similar, estériles.

Almacene a 4° C hasta por 6 meses.

Proteinasa K, 20 mg/mL (600 UI/mL):

A un frasco de Proteinasa K liofilizada de 100,00mg, agregue 5mL de agua desionizada tipo Milli Q estéril. Para mantener estable el reactivo, realice alícuotas de 10-50ul.

Almacene indefinidamente a -20°C

Tris- HCl 1 M pH 8

Pese 121,10grs de Tris-Base y disuelva en 800mL de agua desionizada tipo Milli Q ajustando el pH a 8 con HCl concentrado (Use el pH metro).

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

Autoclave en una botella de vidrio transparente.

Almacene a temperatura ambiente por 6-12 meses (revisar que no este turbio)

SDS 10% p/v

Use mascarilla para pesar el SDS.

Disolver lentamente 100,00g de dodecil-sulfato de sodio en 800mL de agua desionizada tipo Milli Q estéril. Para ayudar a que se disuelva, la solución puede calentarse. Ajustar a 1L en balón aforado, trasvasar a botella de vidrio transparente.

Almacene a temperatura ambiente por un año.

COPIA NO CONTROLADA

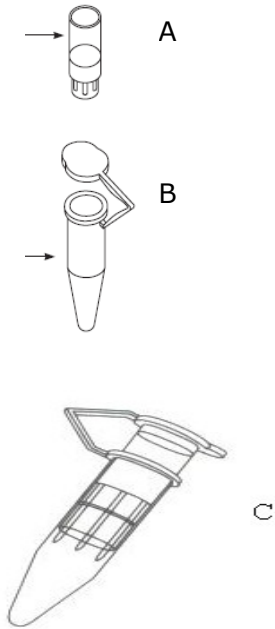
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 26 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

**Anexo No. 02
DIAGRAMA DE ENSAMBLAJE DE LOS TUBOS MICROCON**

User Guide: MICROCON®, Centrifugal Filter Devices,

A- Filtro y Tubo B-ensamblaje

C-Ensamble del tubo Centricon



COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 27 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 3

Preparación de controles

Control positivo:

Impregne sangre humana de un 1(a) donador(a) que no participe en análisis en una tarjeta FTA, rotule como control positivo y seque a temperatura ambiente en la cámara de secado Air Clean Systems. Una vez seco, recorte círculos de 1 o 2 mm² con el mini-sacabocados limpio o con tijeras de metal también limpias. Guarde en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL tipo "eppendorf" o similar rotulado como control positivo. Este control se debe almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración. La preparación de estos controles se deberá registrar en el "Formulario para Reactivos Preparados".

Control negativo:






Control de reactivos.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 28 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 04

Tipos de raíz del elemento piloso

Fases con presencia de células epiteliales adheridas en diferentes fases				
				
<u>Telógena-1</u>	<u>Telógena-2</u>	<u>Catágena-1</u>	<u>Catágena-2</u>	<u>Anágena</u>
Es la última fase de la vida, donde se produce la pérdida o caída del mismo		Fase de crecimiento donde se ralentiza.		Fase de crecimiento donde se desarrolla

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 29 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 05

Almacenamiento y búsqueda en bases de datos mitocondrial mtDNAManager-V1

La base de datos mitocondrial de la Sección de Genética Forense, se encuentra almacenada en la aplicación Web mtDNA manager <http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>
Se almacenan los datos de los haplotipos y también permite realizar búsquedas, tanto en la base BQM como en otras bases de datos de otros países.

1. Realizar el registro: ingresar una dirección de correo y definir una clave o inicie la sesión

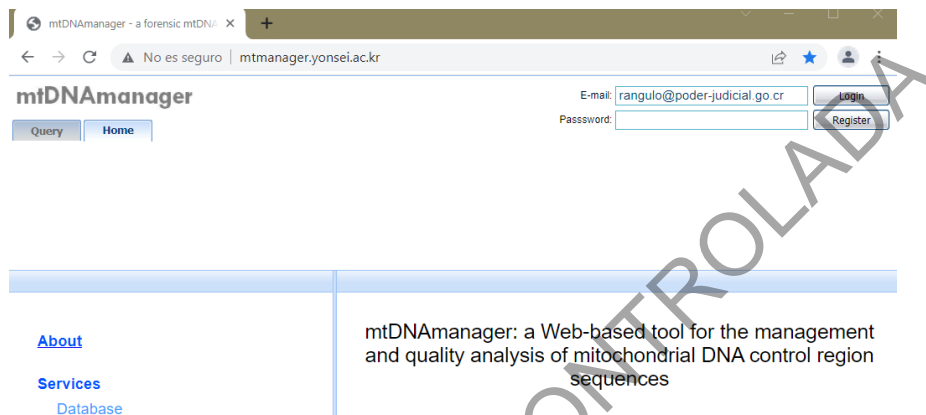
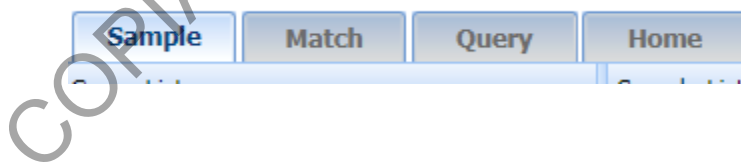
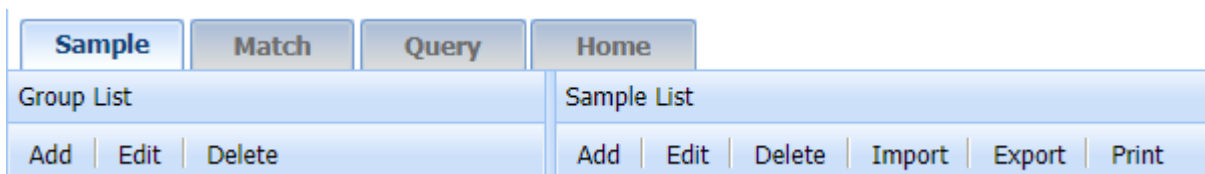


Fig.1 Registro de usuario

2. Presenta un menú de pestañas:



En la cejilla de **sample** aparece el siguiente desplegable:



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 30 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Primero se define el **Group list** (su base de datos) con un nombre e indicando en **Group Información** datos de su interés.

Group Information	
Name	Autopsias
Metapopulation	Admixed
Subpopulation	muestras de Patologia
Description	
HV1	<input checked="" type="checkbox"/>
HV2	<input checked="" type="checkbox"/>
HV3	<input type="checkbox"/>
Control Region	<input type="checkbox"/>
No. of Samples	4

Fig. Definir Group list

En **sample list** aparecen varias cejillas las cuales sirven para manipular los datos correspondientes al **Group List**, definido anteriormente.

- Add** (adiciona los haplotipos)
- Edit** (puede hacer cambios editarlos)
- Delete** (borrar)
- Import** (importar datos)
- Export** (exportar los datos)
- Print** (imprime las búsquedas y resultados)

Ejemplo de un ingreso de datos:

Seleccione el **Group List**: con el que va a trabajar en nuestro caso HV1 y HV2.

Seleccione el **Sample List**: agregue los datos de la secuencia del haplotipo.

Sample ID: Ingrese el número de OT.

Descripción: es dato es opcional, se puede registra el Nombre de la muestra.

Fig.3 Edición de datos

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 31 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Seleccione **submit** para salvar o guardar la información.

3. Luego se despliega de esta forma:

Sample List							
Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16569	np 001-437	np 438-576	Comments	Description
18-12126	A2	A2	16111 16223 16290 16319 16362	73 146 153 235 263 309.1C 315.1C			Juan imp. caso.19-858
A.17-2918				73 263 309.1C 309.2C 315.1C			Sangre
A.17-2919	C1		16298 16325 16327	73 249d 263 290d 291d 309.1C 315.1C			Sangre patologia
A17-1649	B4	B4	16183C 16189 16217	73 263 309.1C 315.1C			FEMUR

Fig. 4 Listado de la búsqueda

En la cejilla **Match:**

Se utiliza para buscar la frecuencia del haplotipo estudiado en las base de datos (Working Group)

Fig. 4 Selección de la búsqueda

Escoja el **Working group** señalando con un click y en **Target Group** señala con un click, la muestra de trabajo correspondiente que desea comparar.

Luego:

- En la ventanilla **My mtDNA** aparece todos los **Working group** definidos por usted, el cual puede señalar con un click para iniciar la búsqueda como se ve en la figura Fig.5

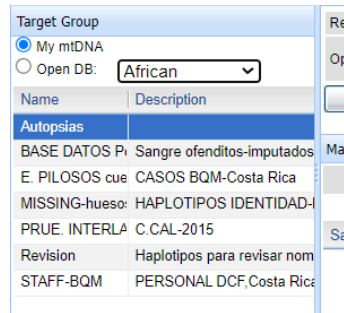


Fig.5 escogencia del target group

También pude realizar búsquedas en la pestaña **Open DB**, De bases de datos de otros países o grupos, seleccionando

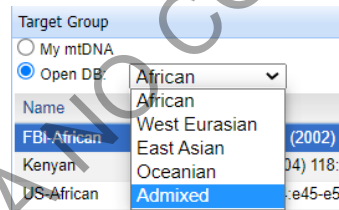


Fig.6 Seleccionando Bases de datos

- En **Matching Options:**

Las búsquedas se pueden realizar de tres formas o fuentes: Seleccionando los grupos con que quiere comparar.

Matching Option

Region HV1 HV2 HV3 Control Region

Option Ignore heteroplasmic insertions in the poly C-stretches

Maximum number of mismatched nucleotides

Fig.7 Escoja la región a comparar y las opciones indicadas

En Match:

Realiza la búsqueda de los grupos seleccionados el **Working Group**, con la muestra **Working Sample** correspondiente **Vrs** el grupo a buscar **Target Group** seleccionado.

El Match All:

Realiza la búsqueda con todos los grupos de su **My mtDNA** definidos por usted

En Worldwide Frequency:

Realiza la búsqueda con todos los grupos (bases de datos) de su **My mtDNA y Open DB**

Ejemplo de una búsqueda:

The screenshot shows the mtDNAManager interface with the 'Match' tab selected. The 'Working Group' list includes 'Autopsias', 'BASE DATOS P. Sangre ofendidos-imputados', 'E. PILOSOS cue CASOS BQM-Costa Rica', 'MISSING-hueso HAPLOTIPOS IDENTIDAD-I', 'PRUE INTERLU C.CAL-2015', 'Revision Haplotipos para revisar nom', and 'STAFF-BQM PERSONAL DCF.Costa Rica'. The 'Working Sample' table shows a sample with 'Sample ID' 09-3764-BIO.B A2, 'Expected HG' A2, and 'Estimated HG' np 16024-16569. The 'Matching Option' section has 'Region' set to 'HVI', 'HV2', and 'HV3', and 'Option' set to 'Ignore heteroplasmic insertions in the poly C-stretches'. The 'Matching Result' table shows 4 matches with a match probability of 0.0258. The 'Match' button is highlighted.

Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16569	np 001-437	np 438-576	Comments	Description
09-3764-BIO.B A2	A2	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C			
12-2998-BIO.A A2	A2	D4b1	16111 16114 16223 16290 16319 16362				15-7594-BQM
12-2998-BIO.A A2	A2	A2	16111 16114 16223 16290 16319 16362	73 146 153 235 263 309 1C 315 1C			14-11080-BQM
12-2998-BIO.B A2	A2	A2	16111 16223 16252 16259 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 309 1C 315 1C			14-11080-BQM
12-3524-BIO.A A2	A2	A2	16111 16223 16290 16319 16362	73 146 153 235 263 309 1C 315 1C			E.P. 17-8659-BQM
13-1487-BIO.A A2	A2	A2	16111 16223 16290 16319 16362	73 146 153 235 263 309 1C 315 1C			15-7520-BQM
13-3732-BIO.A B4	B4	B4	16164 16165 16172 16183C 16189 16217	73 207 263 309 1C 309 2C 315 1C			e piloso

Fig. 8 Selección de coincidencia

En la cejilla **Query:** "consulta"

The screenshot shows the mtDNAManager interface with the 'Query' tab selected. The 'Searching Option' section has 'Region' set to 'HVI', 'HV2', and 'HV3', and 'Option' set to 'Match' and 'Include the queried nucleotide polymorphism'. The 'Searching Result' table shows 1 match with a match probability of 0.0258. The 'Query' button is highlighted.

Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16569	np 001-437
09-12152	A2	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C
CR.00034	A2	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C
CR.00075	A2	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C
DAS	A2	A2	16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315 1C

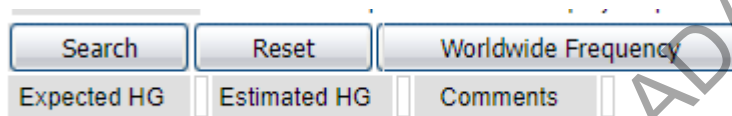
Fig. 9 Consulta del haplotipo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 34 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Pude realizar la consulta o búsquedas ingresando la **secuencia** en el cuadro, escoger la **región** y las **opciones** que crea conveniente **versus** seleccione la **Target Group** que desee. Luego, de click en la cejilla correspondiente. Comentado anteriormente como:



La cual se comporta de la misma forma indicada.



Los resultados aparecen de esta forma:

Matching Result							
No. of Matched Samples	No. of Target Samples	Match Probability	Export		Print		
4	231	0.0258					
Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16569	pp 001-437	np 438-576	Comments	Description
09-12152	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315.1C			OF_Maria
CR.00034	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315.1C			
CR.00075	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315.1C			
DAS	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362	73 146 153 194 235 263 315.1C			Dayanna Araya Saenz.

Fig.10 Resultado de búsqueda

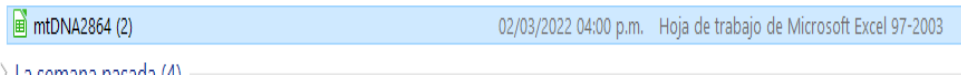
- Número de nuestras coincidentes
- Total de muestras comparadas
- Probabilidad de coincidencias
- Exportar los datos
- Imprimir en DDF

También, aparece información de:

- ID muestra
- El HG (haplogrupo) esperado
- El HG estimado
- La secuencia resultante en regiones
- Comentarios: puede aparecer un dato que podría necesitar revisión (alerta)
- Descripción adicional de la muestras

NOTA:

- Automáticamente, se guardan los datos ingresados en la base al abandonar la aplicación
- Puede imprimir la base de datos en exportar con este formato



Luego, puede abrir el archivo como aparece.
De aceptar y se despliega una ventana como esta.

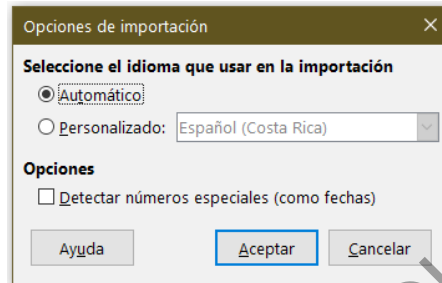


Fig.11 Opciones de importar

- Acepte y aparecen los datos en hoja electrónica, los cuales puede salvar con otro formato.

En las búsquedas, se puede **imprimir**: de click y aparece como sigue:

Sequence Match Information Print

Sequence	16111 16175 16185 16290 16319 16362 73 146 153 194 235 263 315.1C
Region	HV1_HV2
Option	Ignore heteroplasmic insertions in the poly C-stretches, Maximum number of mismatched nucleotides: 0
Expected HG	A2
Estimated HG	
Comments	

Target Group: BASE DATOS Poblacional MT-BQM

No. of Matched Samples	No. of Target Samples	Match Probability
4	231	0.0258

Matched Sample List

Sample ID	Expected HG	Estimated HG	np 16024-16569	np 001-437	np 438-576	Comments	Description
09-12152	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362 73 146 153 194 235 263 315.1C				OF_Maria
CR.00034	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362 73 146 153 194 235 263 315.1C				
CR.00075	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362 73 146 153 194 235 263 315.1C				
DAS	A2		16111 16175 16185 16290 16319 16362 73 146 153 194 235 263 315.1C				Dayanna Araya Saenz. BQM

Fig.12 Impresión

Luego, puede seleccionar el formato a imprimir:

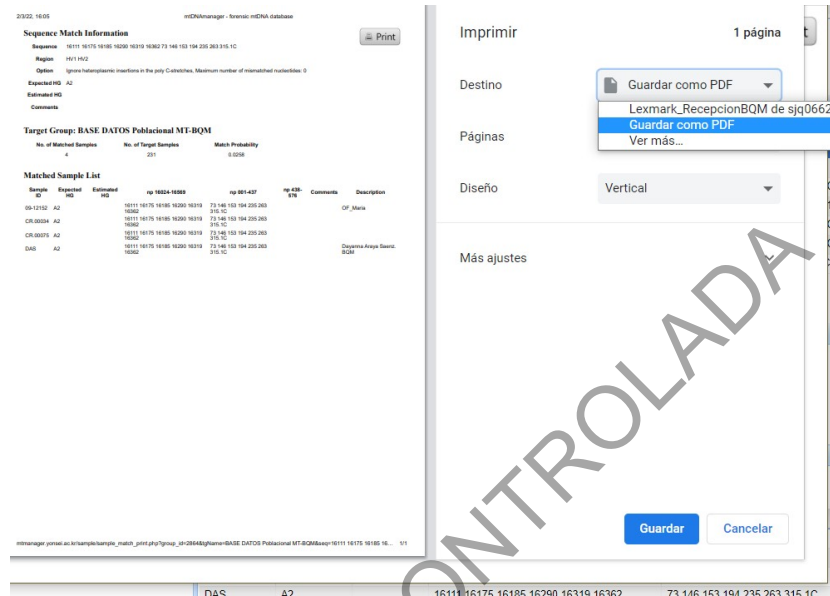


Fig.13 Formato de impresión

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 37 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 06

Consulta en base de datos mitocondrial (EMPOP) V1

Base datos DNAmT EMPPOP <https://empop.online/>

La base de datos EMPPOP apunta a la recolección, control de calidad y presentación de búsqueda de haplotipos de ADNmt de diversas poblaciones mundiales.

1. El análisis de DNAmT es una herramienta poderosa para excluir muestras que se originan del mismo individuo / matrilinea. Si no se pueden excluir dos muestras, la importancia de la coincidencia de ADNmt se evalúa haciendo referencia a la abundancia de esa secuencia de ADNmt particular (= mitotipo) en una población relevante.

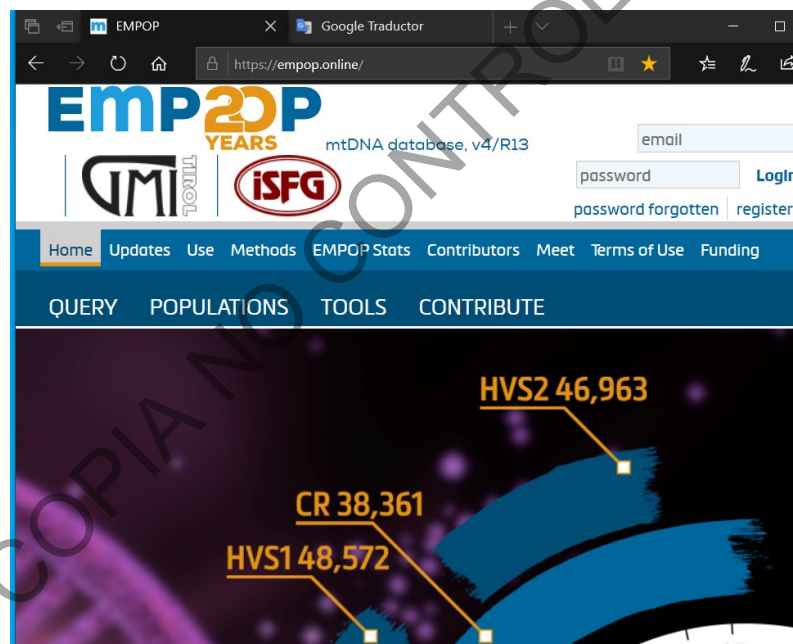


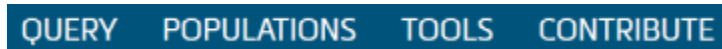
Fig. 1 Interfase de la aplicación EMPPOP

2. Proceda al registro de usuario y contraseña EMPPOP o inicie la sesión
 - Se identifica por la dirección de correo electrónico
 - Siga las instrucciones para registrarse.
 - Se enviará un correo electrónico con un enlace que completa el registro.

Ver fig.1

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 38 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

3. Se presenta 4 cejillas para consulta:



- Query (consulta)
- Populations (Poblaciones)
- Tools (varios)
- Contribute (contribuciones)

NOTA: En nuestro caso, por el momento nos interesa la cejilla Query

4. En **Query:** de "click" y rellene los datos solicitados:

- Sample ID (Identificación de la muestra)
- Rangos (Ingrese el rango 16024-16365, 73-340, etc)
- Profile (Ingrese el perfil o haplotipo a investigar)
- Puede marcar otras opciones que considere necesario (pero por default se puede quedar así)

Fig.2 Ingreso de datos solicitados

5. De "click" en submit (enviar/ok), donde aparece los resultados y otras cejillas.



**PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E
INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL**

P-DCF-ECT-BQM-55

En Result:

Entre las cejillas horizontales de color azul de interés tenemos:

- **Entire Database** (Base de datos completa)
- **Fequency** (frecuencia del haplptipo estudiado)
- **By Origin** (Por origen, Paíces con base de datos representados)
- **By Metapopulation** (Por metapoblación)

Ranges 16024-16365 73-340
Profile 16223T 16265T 73G 150T 195C 263G 3151C

Entire Database	Frequency	Clapper Pearson CI	estimate p
50/46963	1.0647e-3	[79032e-4, 1.4034e-3]	

By Origin	Frequency	Clapper Pearson CI
Africa	4/2577	[1.5522e-3, 4.2308e-4, 3.9699e-3]
America	38/19077	[1.9919e-3, 1.4100e-3, 2.7331e-3]
Asia	3/12148	[2.4695e-4, 5.0931e-5, 7.2153e-4]
Australia (Continent)	0/270	[0.0000e+0, 1.3570e-2]
Europe	5/12795	[3.9078e-4, 1.1269e-4, 9.1171e-4]
Oceania	0/96	[0.0000e+0, 3.7697e-2]

By Metapopulation	Frequency	Clapper Pearson CI
Sub-Saharan African	4/5436	[7.5423e-3, 5.4178e-3, 1.0218e-2]
West Eurasian	3/23481	[1.9966e-4, 2.8802e-5, 4.0809e-4]
South Asian	0/1533	[0.0000e+0, 2.3941e-3]
East Asian	0/4735	[0.0000e+0, 7.7876e-4]
Southeast Asian	0/2996	[0.0000e+0, 1.2305e-3]
Native American	0/7723	[0.0000e+0, 4.7753e-4]
Admixed	6/2955	[2.0305e-3, 7.4549e-4, 4.4142e-3]
Oceania	0/98	[0.0000e+0, 3.6942e-2]

Fig. 3

6. En nuestro caso, nos interesa la consulta de datos poblacionales para Centro América:

- En el espacio "Find origin" (encuentre el origen), introduzca "central america"
- Aparece los países con base de datos representados

PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL

P-DCF-ECT-BQM-55

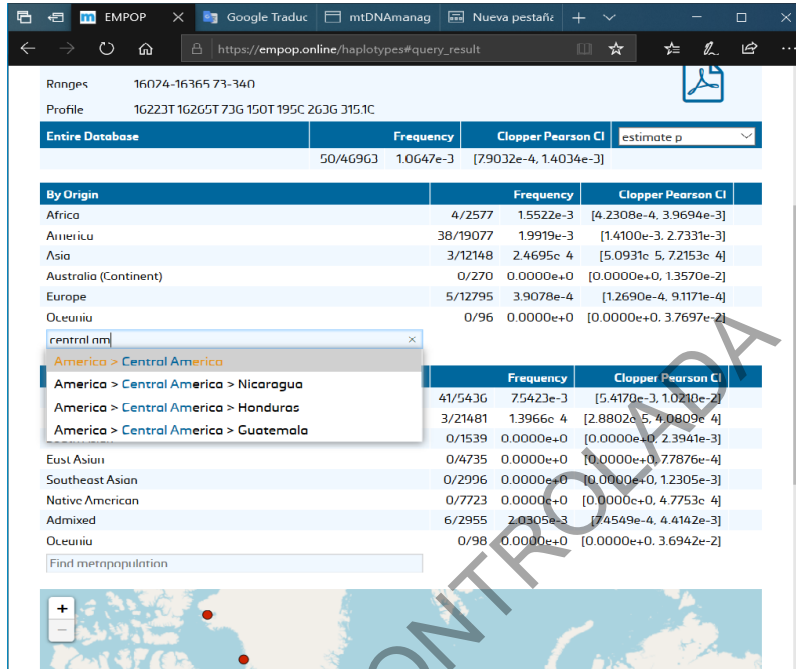


Fig. 4 Resultados de los Países de Centro América

7. En el mismo espacio "Find origin", puede escribir los Países representados de la figura 4:
 - Los detalles de las frecuencias de los haplotipos para cada País, aparecerán

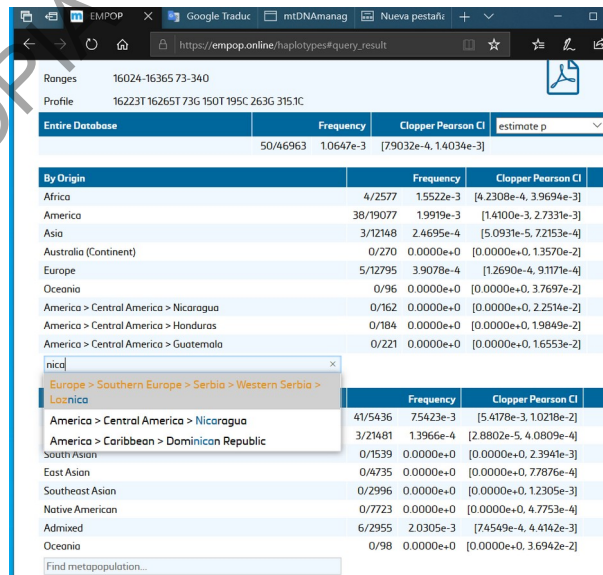
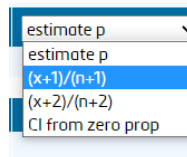


Fig. 5 Frecuencia del haplotipo estudiado por País representado

8. Los resultado obtenidos se respaldan, dando "click" en el este icono



9. En el espacio derecho seleccione la formula de probabilidad (color azul) de Balding y Nichols para calcular el LR



10. En Details:

Puede aparecer algunos detalles del haplogrupo

11. En Neighbors:

Aparecen detalles de los vecinos del haplotipos.

QUERY POPULATIONS TOOLS CONTRIBUTE

Query Result Details **Neighbors** Alignment Haplogrouping

Sample ID 21-1996 A21-503

Ranges 16024-16365 73-340

Profile 16093C 16129A 16189C 16261T 16278T 16293G 16300G 16311C 16354T 73G 146C 150T 195C 263G 3151C

6 of 6 haplotypes shown

Origin					Metapopulation	Cost	Filter	Mutations	Ignored Mutations	Haplogroup (MRCA)		Publications
Continent	Region	Country	Province	City	filter metapopu					filter haplogroup	Rank 1	
America	Northern America	United States of America	North Carolina		Sub-Saharan African	117	2	A16293G (0.72) T16311C (0.45)		L2d+16129	L2d	AFDIL 2011
America	Northern America	United States of America	California	Orange County	Sub-Saharan African	117	2	A16293G (0.72) T16311C (0.45)		L2d+16129	L2d	AFDIL 2013
America	Northern America	United States of America	Arizona	Mesa	Sub-Saharan African	1.47	2	C16261T (0.75) A16293G (0.72)		L2d1a	L2d+16129	AFDIL 2012
America	Northern America	United States of America	California	Orange County	Sub-Saharan African	1.47	2	C16261T (0.75) A16293G (0.72)		L2d1a	L2d+16129	AFDIL 2013
Africa	Eastern Africa	Rwanda			Sub-Saharan African	1.47	2	C16261T (0.75) A16293G (0.72)	3091delC(0.000)	L2d1a	L2d+16129	Augustin 2010
America	Caribbean	Jamaica			Sub-Saharan African	1.47	2	C16261T (0.75) A16293G (0.72)	161931-16193.2delCC(0.000) 3091-309.2delCC(0.000)	L2d1a	L2d+16129	AFDIL 2012

Fig.6 Haplotipos vecinos

12. En Alignment:

Aparece el alineamiento filogenético, los cual deben coincidir, o aparece un aviso (revisar)

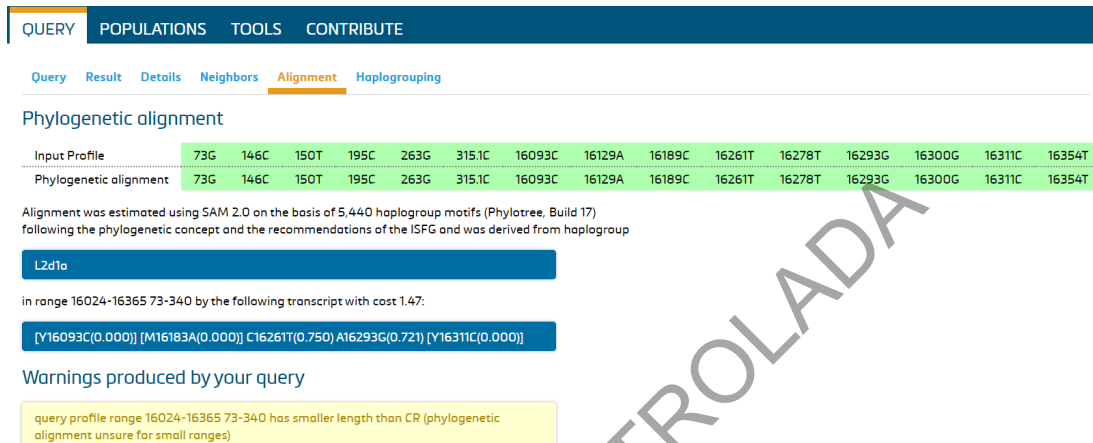


Fig. 7 Alineamiento filogenético

13. En Haplogrouping:

- Aparece la haploagrupación.
- Puede aparecer una a varias posibilidades, dependiente de los datos. Escoger el mejor Haplogrupo
- Un valor de **"Cost"**, el cual debería ser el menor valor. Pero, puede valorarse de acuerdo a las **Missing Mutarions** y **Extra Mutations** un la menor coincidencia con un mayor **"Cost"**.

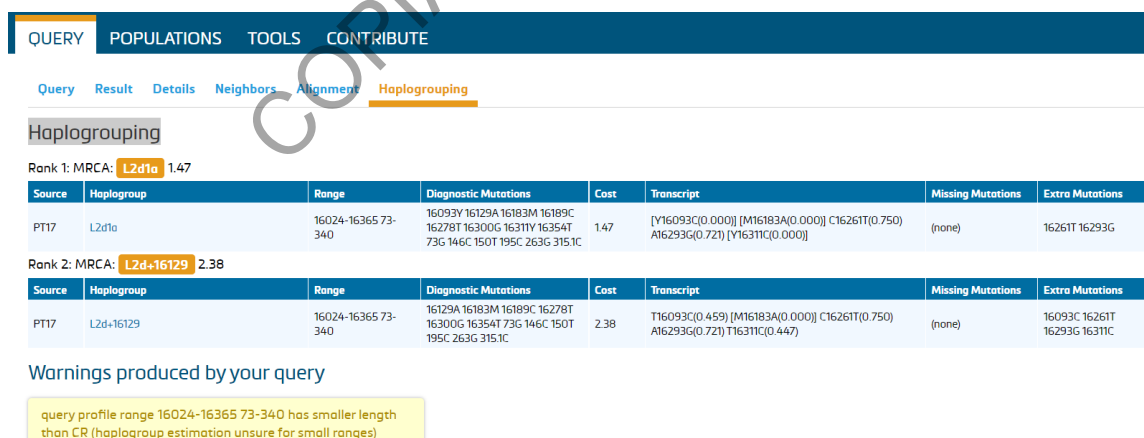


Fig. 8 Haplogrupo y cost

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 43 de 43
PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	P-DCF-ECT-BQM-55	

Anexo No. 07

Coefficiente de Verosimilitud mitocondrial

$$LR = \frac{p(E|H_p)}{p(E|H_d)}$$

← Hipótesis Fiscal
← Hipótesis Defensa

Es el método de corrección de Balding y Nichols

$$\text{Donde } p = \frac{x+1}{N+1}$$

x= número de observaciones del haplotipo en la base de datos

N= número total de haplotipos en la base de datos

El +1 es la corrección de coincidencia

COPIA NO CONTROLADA