Elaborado o modificado por:	**Revisado por Líder Técnico**
Dra. Rossana Oliva Barboza **Perito Judicial II,** **Sección de Biología Forense**	**Máster. Roberto Morales Montero** **Perito Judicial II** **Sección de Biología Forense**
Visto Bueno Encargado de Calidad:	**Aprobado por:**
Dr. Rolando Hidalgo Sibaja **Encargado de la Calidad de la Sección de Biología Forense**	**Lic. John Vargas Fonseca** **Jefatura,** **Sección de Biología Forense**

COPIA NO CONTROLADA

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
Modificaciones a los datos de muestreo hipergeométrico y la inclusión de trabajo de indicios con prueba presuntiva de Kastle-Meyer, así como mejoras en la redacción del procedimiento ya sea por nuevas notas o modificación en las existentes.	015-2026	JVF

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

1. Objetivo:

Este procedimiento describe dos métodos de extracción de ADN a partir de muestras de distintos organismos. Un método es manual, en el cual hay que seguir los pasos recomendados por varios kits comerciales según la muestra que se desee trabajar. El otro es un método que utiliza un equipo robotizado de purificación automatizada llamado *KingFisher APEX Syste*m, el cual trabaja con distintos kits que varían según las muestras de las que se desee extraer el ADN.

2. Alcance:

Este procedimiento se puede utilizar con muestras de distintos organismos tales como sangre, tejidos, pelos, plumas, hojas, semillas, entre otros, con el fin de extraer su ADN, el cual luego será amplificado utilizando la técnica de Barcoding.

Los usuarios de este PON deben tener conocimientos básicos en el uso del equipo robotizado de purificación automatizada llamado KingFisher APEX System del APEX, además el uso de pipetas monocanal o multicanal, tanto mecánicas como electrónicas, uso correcto de la centrífuga y los bloques térmicos, así como tener experiencia en la técnica del pipeteo. El uso del equipo robotizado de purificación automatizada llamado KingFisher APEX System del APEX se adquiere mediante la capacitación recibida por parte del proveedor del equipo o de un funcionario que ya haya recibido esta capacitación, tenga certificación de la misma y la replique a sus compañeros

Este procedimiento está basado en la validación respectiva y sus resultados publicados en el informe de validación cuya identificación es 001-BIO-VAL-2023 y 002-BIO-VAL-2024. Adicionalmente este procedimiento incluye la aplicación de la técnica Kastle-Meyer, validada en 002-BIO-VAL-2020 y los adendum: 007-BIO-VAL-2021, 014-BIO-VAL-2021, 018-BIO-VAL-2021 y 0004-BIO-VAL-2025.

COPIA NO CONTROLADA

3. Referencias:

- Abdel A and Osman G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods 13:1DOI 10.1186/s13007-016-0152-4
- Applied Biosystems. 2024. MagMax Core Nucleic Acid Purification Kit. Guía de usuario. Número de catálogo A32700, A32702
- Applied Biosystems. 2024. MagMax Core Nucleic Acid Purification Kit. Validation of the use of prefilled wash and elution plates with the MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit. Número de catálogo A32700, A32702
- Dittrich G, Wingfield M, Klein H and Slippers B. 2012. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minutegall-inhabiting wasps. Molecular Ecology Resources 12, 109–115 doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03074.
- Gutiérrez R, Martínez-de la Puente J, Gangoso L, Soriguer R, Figuerola J. 2015. Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). Journal of Vector Ecology. Volume40, Issue1: pages 11-15
- Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. 2012. Procedimiento de extracción de ADN/ARN mediante el sistema Quiamp DNA Mini Kit. Código PMT-B-T125.

- Karaaslan C, Akel H, Ünlü S and Perçin I. 2014. Comparison of Six Commercial DNA Extraction Kits for DNA Extraction from Wheat. Hacettepe J. Biol. & Chem., 42 (3),395-400
- Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Linacre A, Lapwong Y, Chotigeat W. 2013. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample análisis. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 e71–e72
- Kitpipit T. Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. 2014. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. Forensic Sci Med Pathol 10:29–38. DOI 10.1007/s12024-013-9521-8
- Pereira F, Carneiro J, and Asch B. 2010. A Guide for Mitochondrial DNA Analysis in Non-Human Forensic Investigations. The Open Forensic Science Journal, 3, 33-44 33.
- Policía Nacional de Colombia. Procedimiento Código: 2DC-GU-0073: MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN EL LABORATORIO DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA FORENSE DE ESPECIES SILVESTRES.
- Qiagen. 2020. Quick Start Protocol. DNeasy® Blood & Tissue. Código 69506.
- Qiagen. 2020. Quick Start Protocol. DNeasy® Plant Mini Kit. Código 69106.
- Schiebelhut L, Abboud S, Gómez L, Swift H, Dawson M. 2016. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. Molecular Ecology Resources 17, 721–729 doi: 10.1111/1755-0998.12620
- Thermo Scientific. 2024. Generalidades KingFisher Apex.
- Thermo Scientific. 2024. KingFisher Apex Purification System User Guide.
- Thermo Scientific. 2024. Manual de Phire Tissue Direct PCR Master Mix. Código F170S.
- Thermo Scientific. 2016. NanoDrop One Espectrofotómetros micro-UV/Vis. Guía del usuario.
- Wang L, Maddox C, Prarat M, Zhang Y, Yan L, Ramachandran A, Narayanan SS, Patil G 2022. Extraction of bacterial DNA using MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit on KingFisher™ Flex Instrument. Protocols. https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgb781ovpk/v2Version created by Sarah Nemser

COPIA NO CONTROLADA

4. Equipos y Materiales:

- Balanza analítica marca Mettler Toledo XP Excellence Plus**,** modelo XP204, con un rango de pesada de 0,1 mg hasta 200.0000 g e incertidumbre de ±0,0005g, o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Bloque térmico marca Eppendorf modelo C o similar, con los siguientes parámetros de operación: rango de temperatura de 1 a 100 °C con incertidumbre de ±0,5°C en temperaturas entre 20 y 45 °C y ±1,0°C en temperaturas fuera del rango anteriormente indicado y frecuencia de mezcla entre 300 y 3000 rpm.
- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, no punzocortante.
- Cajas de plástico para guardar tubos de para microcentrífuga de 1,5 mL y 2 mL.
- Centrífuga refrigerada marca Eppendorf, modelo 5430R, o similar, con capacidad para alcanzar 14000 rpm, con adaptadores para filas de tubos PCR y placas PCR y su correspondiente libro de control de uso.

- Cubre bocas
- Cubre cabezas.
- Equipo de medición de temperatura y humedad, marca Amprobe, modelo TR300, o similar.
- Equipo para macerar muestras, marca Qiagen, modelo TissueLyser, o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Espectrofotómetro de micro volumen marca Thermo Scientific, modelo NanoDrop One o similar, y su correspondiente libro de control de uso.
- Estereoscopio marca Zeiss, modelo Stemi 2000 –C o similar y su correspondiente libro de control de uso.
- Formulario de Análisis de ADN no humano
- Formulario: Determinación de muestreo hipergeométrico en casos de Genética no humana
- Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo.
- Gabacha desechable limpia o de tela que se encuentre limpia.
- Gradillas para tubos de microcentrifuga, limpias.*
- Guante criogénico.
- Guantes desechables de nitrilo o similar.
- Horno para secar muestras, similar o igual a marca Fisher Scientific, Modelo Isotemp
- Jeringas para la pipeta electrónica de dispensador múltiple igual o similar a marca Eppendorf, modelo Combitips Advanced. Presentación en volúmenes de 0.5 mL, 0.1 mL y 5 mL.
- Lapicero.
- Lápiz de grafito.
- Marcador de tinta indeleble.
- Mascarilla desechable.
- Micropipeta electrónica Eppendorf Xplorer, o similar, con volumen graduable de 5,0 a 100,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta electrónica Eppendorf Xplorer, o similar, con volumen graduable de 50 a 1000,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 0,5 a 10,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 0,1 a 2,5 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 10,0 a 100,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta Eppendorf Research Plus, o similar, con volumen variable de 100,0 a 1000,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*
- Micropipeta multicanal Eppendorf Research Plus de 8 canales, o similar, con volumen graduable de 0,5 a 10,0 uL, calibrada, verificada y limpia.*

COPIA NO CONTROLADA

- Micropistilos, limpios y autoclavados.
- Minicentrífuga marca Fisherbrand, modelo Sprout Plus o similar, con adaptadores para filas de tubos PCR.
- Mortero.
- Papel blanco.
- Pinzas limpias y autoclavadas.
- Pipeta electrónica de dispensador múltiple, marca Eppendorf, Modelo Multipette E3x, con volumen variable de 1 uL a 50 mL, verificada y limpia.
- Placas petri plásticas de diversos tamaños**
- Puntas para micropipetas para dispensar de 0,5 a10 uL, limpias y/o autoclavadas.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 100-1000 uL, limpias y/o autoclavadas.
- Puntas para micropipetas para dispensar de 20-200 uL, limpias y/o autoclavadas.
- Recipientes de material plástico rígido para "punzocortantes", preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra acompañada del símbolo de biopeligrosidad.
- Sistema Automatizado de Purificación de ADN, ARN, proteínas y células, marca Thermo Fisher Scientific, modelo KingFisher Apex System y su correspondiente libro de control de uso.Tapas adhesivas para placas PCR.
- Tijeras autoclavadas.
- Toallas desechables tipo "Kimwipes".
- Tubos cónicos de 15 ml, nuevos y limpios
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, nuevos y autoclavados.
- Tubos para microcentrífuga de 2 mL, nuevos y autoclavados.
- Vórtex marca Benchmark, modelo Benchmixer o similar.

*Para su limpieza, limpie con DNA away, posteriormente con alcohol al 70% para eliminar el exceso, utilizando kimwipes. En el caso de las micropipetas limpie la parte externa de las mismas.
** El tamaño escogido dependerá del tamaño de la muestra que se esté trabajando.

COPIA NO CONTROLADA

5. Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua desionizada.
- Control positivo de sangre humana. *
- Control Negativo para el análisis de Kastle. *
- Dneasy Blood & Tissue Kit, marca Qiagen, Cat. N°. 69504.
- Dneasy Plant Mini Kit, marca Qiagen, Cat. N°. 69106.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70% grado comercial.

- Etanol al 95% para kit de Kastle-Meyer. *
- Fenolftaleína para kit de Kastle-Meyer. *
- MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit, marca Applied Biosystems, Cat. N° A32700 y/oA32702.
- Nitrógeno líquido.
- PBS pH 7.4 similar o igual a marca Gibco, Cat. N° 10010023.
- Peróxido de hidrógeno al 3% para kit de Kastle-Meyer. *
- Solución DNA Away, marca Molecular BioProducts, Cat. N° 7010, o similar.

* Para preparación ver Procedimiento para la Búsqueda, Levantamiento, Análisis, Embalaje y Conservación de Elementos Traza

6. Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura del laboratorio	15 °C ± 2 °C	24 °C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.
2	Temperatura de la refrigeradora	2°C ± 2 °C	8°C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.
3	Temperatura del congelador	No aplica	-10°C ± 2 °C	Esta temperatura debe ser revisada al menos dos veces al día con un registrador de temperatura digital o similar y registrada en el Formulario: Registro de condiciones de temperatura de áreas de trabajo. Para la temperatura de la mañana, se anotará el promedio de la medición de las primeras 12 horas del día y para la tarde el promedio de la

COPIA NO CONTROLADA

				medición de las últimas 12 horas. Idealmente la extracción y procesamiento de los datos se realizará de manera diaria.

7. Procedimiento:

7.1 Muestreo hipergeométrico

7.1.1 Agrupe los indicios recibidos de acuerdo a sus características morfológicas, origen y el resto de datos del caso, si son más de **"10"** posibles individuos que comparten características y se tiene la hipótesis de que son de una misma especie aplique un muestreo hipergeométrico, de ser menos que lo indicado se debe montar al menos una muestra por individuo y continuar con la preparación de la muestra en el punto 7.2 de este procedimiento

7.1.2 Utilice la hoja de cálculo llamado "Determinación de muestreo hipergeométrico en casos de Genética no humana" asociada a este procedimiento. La hoja está hecha para que el usuario inicialmente ingrese los datos en los espacios:

- **N°DCF**: Registre el número del caso asignado en el SADCF.
- **Fecha de muestreo:** Registre la fecha en la que se realizó el proceso
- **ID de objeto o embalaje en el SADCF**: Registre el ID de objeto asignado al grupo total de indicios o bien el embalaje asociado al mismo
- **Otros datos del indicio o caso**: Registre otros detalles que puedan ser de ayuda para la identificación del indicio o datos generales de ayuda.
- **N: Número de indicios agrupados**: Es el total de individuos presentes en la muestra que comparten características (números entre 10 y 10000 según la programación de la hoja de cálculo actual)

Nota N.°01: Asegúrese de que cada uno de los individuos agrupados estén rotulados o sean identificables con números consecutivos a partir del 1. Si son más de **10** solamente se deben rotular debidamente las muestras que se van a elegir para procesar según el muestreo hipergeométrico

7.1.3 Luego de que se registren los datos del punto anterior, la hoja de cálculo mostrará lleno los siguientes campos:

- **Proporción mínima aceptable (%):** Es la proporción de individuos de la muestra que se desea analizar. Debe tomar en cuenta que este número es el que indica la proporción de la muestra total sobre la cual se va a concluir. La tabla ajusta automáticamente los siguientes porcentajes:
  - de 10 a 29 indicios es 55%
  - de 30 a 99 indicios es 65%
  - de 100 a 299 indicios es 75%
  - de 300 a 10000 indicios es 85%
- **K: Mínimo número de elementos conformes en la población**: indica la cantidad total de individuos que serían aceptados dentro del grupo establecido según el porcentaje "Proporción mínima aceptable (%)"
- **Confianza mínima aceptable**: En la hoja siempre estará establecido en 95% este dato indica la certeza sobre la que se concluirá

COPIA NO CONTROLADA

- **n: Número de muestras a analizar (si todas las muestras cumplen)**: Indicará el total de muestras que se deberán analizar, de las que se espera que todos los resultados sean idénticos.
- **Confianza real aceptada**: Muestra el porcentaje real obtenido, este siempre será igual o superior a 95%.

Nota N.°02: Si al finalizar el análisis de las muestras seleccionadas mediante muestreo hipergeométrico se identifican dos o más especies dentro de la misma submuestra, **no** se permite concluir en términos de proporciones hipergeométricas de la muestra, por lo que se concluiría en términos de muestreo no paramétrico (conclusión por individuo analizado)

- **Números sugeridos para el muestreo al azar**: La tabla va a sugerir números al azar entre 1 y el número de muestras totales, estos servirán para que el usuario seleccione las muestras con dichos números asignados. En la misma tabla se mostrará "sombreado en gris" los números que estén repetidos, para que se evite seleccionar.

7.1.4 Luego de que se llenan los campos la hoja debe guardarse como PDF adjuntarse al legajo del SADCF, tener presente que cuando se hace cualquier cambio en el documento de la hoja de cálculo se actualiza los números sugeridos para el muestreo al azar, por lo que el último dato guardado en el PDF debe corresponder a las muestras realmente muestreadas.

7.2 Preparación de la muestra

Nota N.°03: Para la preparación previa de algunas muestras, tales como elementos pilosos, heces, huevos o plumas, se debe revisar el Anexo 5. Asimismo, en caso de que se vayan a trabajar prendas, aplicadores u objetos para el análisis y levantamiento de elementos pilosos o de muestras con aparente sangre de origen no humano, se deben seguir las indicaciones del Anexo 7. Sin embargo, si la muestra que se está analizando presenta altas probabilidades de ser sangre, no es necesario realizar el proceso de Kastle-Meyer indicado en dicho anexo; por ejemplo, en el caso de un aplicador impregnado de sangre.

7.2.1 Al momento de trabajar muestras utilice gabacha, cubre cabezas, cubre bocas y guantes.

7.2.2 Limpie la zona donde va a trabajar, primero con DNA Away y luego con alcohol al 70 %

7.2.3 Coloque en la zona donde va a trabajar, un pliego de papel blanco.

Nota 1: La zona de trabajo en la cual se hace esta preparación de las muestras, debe ser una zona ubicada fuera de laboratorio de ADN.

7.2.4 Tome un fragmento de la muestra e introdúzcala dentro de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.

7.2.5 Rotule al menos el tubo con el número de DCF seguida de una letra que hace referencia al indicio y por último un número consecutivo de muestra. Ejemplo: 24-0002-BIO/AM01

7.2.6 En caso de ser requerido por el kit proceda a pesar el tubo con la muestra cortado en la balanza analítica.

Nota N.°04: Dependiendo de la muestra que va a trabajar, utilice herramientas como pinzas y tijeras autoclavadas y un estereoscopio, para tomar el fragmento de la muestra.

Nota N.°05: El tamaño o peso que se requiere de cada tipo muestra lo indica cada kit de extracción sea manual o automatizado (Anexos 1,2,3 y 4).

COPIA NO CONTROLADA

Nota N.°06: En el caso de que la muestra este sucia (ejemplo hojas de plantas) y se considere que eso puede afectar, proceda a lavarla con agua desionizada, antes de tomar el fragmento de la muestra.

Nota N.°07: Si la muestra es de una composición muy dura o rígida, como por ejemplo semillas de plantas, puede utilizar nitrógeno líquido con su guante criogénico o el equipo para macerar muestras "TissueLyser II", tal como lo indica el manual de uso. En caso de que las muestras o indicios no permitan ser procesadas con el macerador o con nitrógeno líquido, ya sea por su tamaño o composición (ejemplo piedras o prendas de vestir), puede cortar un fragmento o realizar un levantamiento con aplicador húmedo o seco (dependiendo el estado de la muestra) de la superficie del indicio.

Nota N.°08: En casos de aplicadores impregnados de sangre, fluidos o tejidos biológicos, se debe de tomar dos cortes pequeños de cada cara del aplicador para formar la muestra

Nota N.°09: Si la muestra se encuentra conservada en alcohol, la misma se debe dejar secando en el horno a 36 °C hasta que el alcohol se evapore en su totalidad.

Nota N.° 10: Dependiendo de la cantidad de muestra disponible, del tipo de caso y de los reactivos disponibles, se podrá valorar, en conjunto con el perito, la realización del proceso de extracción por duplicado para cada muestra.

Nota N.°11: Mientras los controles funcionen, los reactivos se pueden usar, aunque ya haya pasado su fecha de vencimiento, ya que los mismos son muy estables si se almacenan en las condiciones que el fabricante indica

COPIA NO CONTROLADA

7.3 Extracción Manual

Nota N.°12: Para realizar los pasos de la extracción ya puede ser dentro del laboratorio de ADN, para lo cual debe preparar la mesa de trabajo de la misma manera que se indicó en los puntos 7.2.2 y 7.2.3

Nota N.° 13: Inicialmente, si se está trabajando con tejidos o fluidos biológicos no humanos, los casos se procesan mediante extracción automatizada en el equipo KingFisher APEX con el kit específico para este tipo de muestras; esto debido a que existe menos manipulación disminuyendo así la posibilidad de contaminación y por la rapidez del proceso. Sin embargo, se puede valorar la realización de la extracción manual en lugar de la automatizada, cuando se trabajen con pocas muestras o dependiendo de la disponibilidad de reactivos y consumibles del APEX, utilizando para esto el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen, validado por la casa comercial y verificado por la sección. En el caso de utilizar el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen, se siguen los pasos que indica el protocolo diseñado por la casa comercial (Anexo 1) con la única excepción que en el punto 8 en lugar de agregar 200 ul de Buffer de elusión, se agregan 100 ul para tejidos como orejas, escamas, piel, aletas y aplicadores, que fueron los volúmenes que se verificaron en la validación.

Nota N.°14: Si se trabajan con plantas, se debe usar la extracción manual, con el kit DNeasy Plant Mini de Qiagen, debido que para plantas el APEX no cuenta con un kit específico.

Nota N.°15: En caso de plumas, pelos y uñas, este kit ofrece un protocolo aparte para este tipo de muestras, el cual se debe de seguir tal cual fue diseñado por el proveedor (Anexo 2).

7.3.1 En el caso de utilizar el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen, se siguen los pasos que indica el protocolo diseñado por la casa comercial (Anexo 3).

7.4 Extracción Automatizado (con el KingFisher APEX) con el kit para tejidos MagMAX CORE Nucleic Acid Purification.

Nota N.°16: Utilice las muestras, que están en los tubos para microcentrífuga de 1,5 mL o de 2mL del punto 7.2.4, en caso de que amerite ser procesados por este tipo de extracción

7.4.1 Inicialmente encienda el equipo en el botón trasero, del lado izquierdo, espere alrededor de un minuto y luego enciéndalo en el botón frontal (Figura 1).

7.4.2 Espere que la pantalla del equipo le solicite, el Usuario: BIO-OIJ y Contraseña: Bio1234.

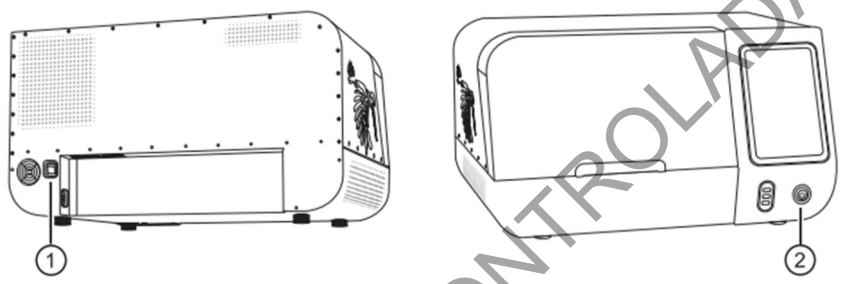


Figura 1. Botones de encendido/apagado. 1. Trasero. 2. Frontal

COPIA NO CONTROLADA

7.4.3 Seleccione en la pantalla de inicio del instrumento, en la barra de herramientas, la ventana "correr protocolo".

Nota N.°17: En la pantalla de inicio los usuarios con perfil de administrador pueden acceder a las siguientes funcionalidades: Editor de protocolos, Biblioteca de protocolos, Historial de ejecución, importar/Exportar, Instrumento, Configuración y Perfil de usuario. Todos los usuarios pueden ejecutar protocolos. Los usuarios también pueden crear, abrir y buscar protocolos.

7.4.4 Dentro de la ventana de correr protocolo, se muestran varias opciones, escoja la que indica "abrir protocolo".

7.4.5 Seleccione el protocolo llamado: "*MagMAX_CORE_Heated:V2*" (Anexo 4)

7.4.6 Abra la ventana transparente del equipo, tirando hacia arriba.

7.4.7 Coloque las placas en el orden que solicita el equipo.

7.4.8 Al terminar el proceso, retire las placas y traslade las muestras de cada pocillo de elusión a un tubo de microcentrífuga con tapa, debidamente rotulado y proceda a tapar cada una de las placas con las tapas adhesivas para PCR.

Nota N.°18: Los pocillos de las placas que quedaron sin usar se pueden utilizar en las próximas corridas. Asegúrese de marcar debidamente los espacios utilizados para no incurrir en

contaminación de las muestras posteriores al uso de una placa. La marca de los pocillos usados se hace colocando una raya vertical al finalizar cada columna de la placa con un marcador indeleble y en caso de pozos aislados marcarlos dentro de un círculo.

Nota N.°19: En la fase de extracción de ADN, se monta solo un control negativo.

7.4.9 Encienda la luz UV del equipo y seleccione una hora de tiempo de exposición y luego de que transcurra el tiempo de descontaminación, apague el equipo, primero por el botón delantero y luego de alrededor de un minuto por el botón trasero.

7.5 Cuantificación de ADN en el Espectrofotómetro de micro volumen.

Nota N.°20: En el caso de que se utilice el kit Phire Tissue Direct PCR Master Mix, el mismo no se puede cuantificar debido a la manera directa de realizar la extracción.

7.5.1 Encienda el equipo en el botón ubicado en la parte trasera del mismo y espere que se encienda la pantalla del equipo.

7.5.2 Realice una limpieza con agua desionizada del pedestal, colocando 3 uL de agua y dejando actuar unos 5 minutos. Luego, limpie con toallas desechables tipo "Kimwipes" el pedestal.

Nota N.°21: Cada vez que se desee tener acceso al pedestal se debe levantar el brazo, y para que realice la limpieza o la lectura se debe bajar el brazo (Ver Figura 2)

COPIA NO CONTROLADA

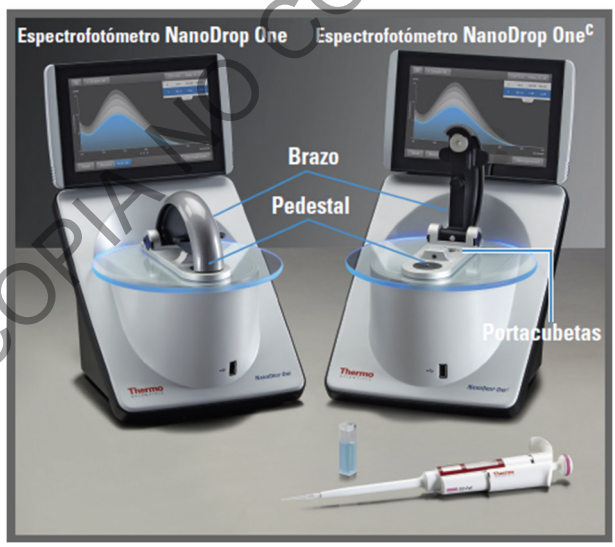


Figura 2. Pedestal y Brazo del Espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop One)

7.5.3 Seleccione en la pantalla táctil del equipo, el ícono que corresponde al análisis de ADN, el mismo indica "dsDNA" o en la versión en español ADNbc (Ver Figura 3)



Figura 3. Aplicaciones en pantalla táctil del Espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop One)

COPIA NO CONTROLADA

7.5.4 Inicie con el montaje del blanco, colocando en el pedestal, 2ul del blanco que consiste en el Buffer de Elusión utilizado por cada kit de extracción.

7.5.5 Seleccione en la pantalla táctil, el ícono que indica "blanco" y baje el brazo para que inicie la lectura.

7.5.6 Limpie el pedestal con un trozo de toalla desechable tipo "Kimwipes".

7.5.7 Debe colocar además de las muestras un control positivo y negativo:

- Control Positivo: Se utilizan 2ul de un extracto de ADN conocido y cuantificado previamente
- Control Negativo: Se utilizan 2ul de agua libre de nucleasas

7.5.8 Ingrese un nombre a la muestra, escribiendo en la pantalla táctil el nombre de cada muestra o extracto, el cual debe conformarse por el número de OT acompañado por una letra que corresponde al indicio donde se tomó la muestra, seguida por un número consecutivo de muestra. Ejemplo: 25-0001, A01

7.5.9 Vortexée el extracto a cuantificar por unos segundos hasta que se vea bien homogenizado

7.5.10 Inmediatamente después de vortexar, coloque 2 ul del extracto de ADN a cuantificar en el pedestal, baje el brazo para que inicie la lectura.

Nota N.°22: La lectura se debe centrar en la concentración de ácido nucleótido (ng/uL)

Nota N.°23: Luego de hacer la lectura de la concentración de una muestra, se debe limpiar el pedestal antes de agregar otra muestra, igual como se indica en el punto 7.4.2.

Nota N.°24: Una vez que coloca la muestra en el pedestal y baja el brazo, el equipo inicia de manera automática la lectura, lo que se debe ingresar de manera manual es el nombre de cada una de las muestras antes de iniciar con la lectura.

Nota N.°25: Repita los pasos 7.5.6, 7.5.7, 7.5.8 y 7.5.9 para cada una de los extractos que va a cuantificar.

Nota N.°26: Aproximadamente cada 10 muestras leídas, se debe montar un blanco, tal como lo indica el punto 7.5.4

Nota N.°27: Las muestras con cuantificaciones sobre 60ng/uL se deben diluir 1/10 (1uL de muestra en 9uL de agua destilada libre de nucleasas) y las muestras con cuantificaciones de más de 700ng/uL se diluyen 1/100 (1uL de muestra en 99uL de agua destilada libre de nucleasas). Los tubos de microcentrífuga deben quedar debidamente rotulados con la dilución aplicada.

Nota N.°28: En caso de que durante el proceso de análisis se agote la dilución y sea necesario preparar una nueva, recuerde montar siempre los controles correspondientes a esta etapa, descritos en el punto 7.5.7 de este procedimiento. Si los valores obtenidos en la nueva cuantificación difieren significativamente de los resultados originales, repita la etapa de cuantificación. Si la discrepancia persiste, comuníquese con el líder técnico para la verificación de los resultados.

Nota N.°29: Para considerar una muestra positiva en el proceso de extracción, en el NanoDrop, la misma debe dar igual o mayor al 1ng/uL, sin embargo, como excepción para el control negativo la lectura en el NanoDrop debe dar mayor a 2ng/uL, esto se debe a que por los reactivos que se utilizan para montar dicho control, es posible obtener falsos positivos menores al 2ng/uL.

7.5.11 Cierre la ventana en la cual se encuentra generando las lecturas.

7.5.12 Realice una limpieza del pedestal agregando al mismo 3ul de agua desionizada, tal como lo indica el punto 7.5.2

7.5.13 Apague el equipo en la parte trasera del mismo.

7.5.14 Coloque en el pedestal un trozo de toalla “kimwipes” y deje el brazo del equipo abajo.

COPIA NO CONTROLADA

8. Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
01	Control positivo	Obtener un resultado de cuantificación en el espectrofotómetro de micro volumen menor o igual al 1 ug/uL.	Repetir el proceso de extracción y de cuantificación
02	Control negativo	Obtener un resultado de cuantificación en el espectrofotómetro de micro volumen mayor a 2 ug/uL.	Consultar al Líder Técnico para valorar si se acepta o se repite algún paso del proceso o se deja así y se lleva hasta PCR

9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10. Reporte de Análisis y Resultados:

Se debe completar el formulario llamado "Formulario de Análisis de ADN no humano", en el mismo debe colocar el resultado obtenido según la cuantificación brindada la por el equipo

Los resultados que se reportan pueden ser los siguientes:

Positivo: Aquellos extractos que, al momento de cuantificarlos, obtienen un resultado igual o mayor al 1 µg/uL.

Negativo: Aquellos extractos que, al momento de cuantificarlos, obtienen un resultado menor al 1 µg/uL.

Si para la preparación de las muestras se requirió el levantamiento de elementos pilosos o la realización de la prueba de Kastle-Meyer, debe tener en cuenta las indicaciones del Anexo 7

COPIA NO CONTROLADA

11. Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Antes de ingresar al laboratorio de ADN no humano, recuerde colocarse gabacha, mascarilla, cubre cabezas y guantes, para prevenir fuentes de contaminación en el proceso.
- En la mesa de trabajo, debe colocarse un pliego de papel blanco, estos papeles se desechan cuando se finaliza el trabajo o cuando por alguna razón el mismo se contaminó con alguna muestra o reactivo. Además, esta mesa de trabajo cuando se retira el papel blanco se limpia con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Siempre antes de iniciar a trabajar y después de trabajar, limpie la parte externa de las micropipetas con descontaminante DNA Away o similar y/o con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Revise que los reactivos cumplan las normas mínimas de calidad (botellas bien cerradas, almacenados de manera correcta según corresponda, rotulados de manera correcta).
- Recuerde que el material que se usa en este proceso (puntas, tubos eppendorf, tubos de PCR, tiras y tapas de tubos de PCR) debe estar autoclavado.
- El material usado como puntas o restos de muestras y los guantes deben ser desechados en los basureros correspondientes según el tipo de desecho para material bioinfeccioso, rotulados para tal fin.
- En caso de una contaminación de la piel con alguna de las muestras analizadas, lave la zona afectada con abundante agua y jabón, luego aplique alcohol al 70%.

Al terminar de trabajar en su área de trabajo, recuerde dejar todo ordenado y limpio para que otro analista pueda ingresar a trabajar sin problema. Bajo ningún motivo deje muestras o material de laboratorio expuesto, todo debe quedar guardado en las gavetas de los muebles del laboratorio o gavetas de los refrigerados o congeladores correspondientes.

12. Simbología:

°C: Grados Celsius, unidad de medida de temperatura

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Cat. N°: Número de Catálogo

mL: Mililitros

OT: Orden de trabajo

PON: Procedimiento operativo normado

RPM: Revoluciones por minuto

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses

µg: Microgramo

µL: Microlitros

13. Terminología:

Autoclavado: Proceso de limpieza y eliminación de todas las bacterias de los instrumentos médicos y otros equipos en una autoclave.

Control negativo: Es aquella muestra que no contiene ADN como por ejemplo el agua

Control positivo: Es aquella muestra que se sabe que contiene ADN, como por ejemplo algún extracto anteriormente cuantificado

Desechos punzocortantes: El desecho punzocortante es todo objeto metálico, plástico y de cristal, con capacidad de penetrar y/o cortar tejidos humanos, facilitando el desarrollo de infección.

COPIA NO CONTROLADA

14. Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.
02	Procedimiento para la extracción de ADN para pelos y plumas utilizando el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.
03	Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen.
04	Procedimiento para la extracción utilizando el equipo APEX y el kit para tejidos MagMax.
05	Procedimiento para preparar algunas muestras
06	Verificaciones de equipos críticos
07	Levantamiento de elementos pilosos y Análisis por Kastle-Meyer

Anexo 1.

Procedimiento para la extracción manual de ADN con el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen.

Notas antes de comenzar:

- Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Re disuelva los precipitados en los tampones AL y ATL.
- Agregue etanol a los concentrados de tampón AW1 y AW2.
- Equilibre el tejido congelado o los pellets de células a temperatura ambiente.
- Precaliente en el bloque térmico a 56 °C.
- Consulte el manual para el pretratamiento de tejido fijado, insecto, bacteria u otro material.
- Utilice micropipetas o la pipeta electrónica de dispensador múltiple y sus jeringas combitips, dependiendo de la cantidad que vaya a pipetear y si debe pipetear el mismo reactivo en la misma cantidad en varios tubos.

1a. Tejido: corte el tejido (≤10 mg de bazo o ≤25 mg de otro tejido) en trozos pequeños y colóquelos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Para las colas de roedores, use 1 (rata) o 2 (ratón) de 0,4–0,6 cm de longitud de cola. Agregue 180 µl de tampón ATL. Añadir 20 µl de proteinasa K, mezclar mediante agitación con vortex. Incube a 56 °C en el bloque térmico usando el modo de agitación para que se agite la muestra durante la incubación aproximadamente a 300 RPM. El tiempo de incubación será para tejidos comunes entre 1 a 3 horas, colas de roedores de 6 a 8 horas y para tejidos duros o complejos, existe la incubación nocturna en la que se dejan toda la noche. La incubación termina oficialmente cuando el tejido se ha lisado por completo (la solución se vuelve clara o homogénea. Finalizada la incubación, agite con el vortex durante 15 s directamente antes de continuar con el paso 2.

Nota: Según el tamaño o tipo de muestra, para poder tomar la muestra se requiere colocar la misma en placas petri, esto puede facilitar el manejo de la misma

1b. Sangre no nucleada: pipetear 20 µl de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml. Añadir 50–100 µl de sangre tratada con anticoagulante. Ajustar el volumen a 220 µl con PBS. Continuar con el paso 2.

1c. Sangre nucleada: pipetee 20 µl de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml. Agregue 5–10 µl de sangre tratada con anticoagulante. Ajuste el volumen a 220 µl con PBS. Continúe con el paso 2.

1d. Células cultivadas: centrifugue un máximo de 5 x 106 células durante 5 min a 300 x g (190 rpm). Re suspenda en 200 µl de PBS. Agregue 20 µl de proteinasa K. Continúe con el paso 2.

2. Agregue 200 µl de tampón AL. Mezcle bien mediante agitación con el vórtex. Incube las muestras de sangre a 56 °C durante 10 min.

3. Agregue 200 µl de etanol (96–100%). Mezcle bien mediante agitación con el vórtex.

4. Pipetear la mezcla en una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a ≥6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

COPIA NO CONTROLADA

5. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Agregar 500 µl de tampón AW1. Centrifugar durante 1 minuto a ≥6000 x g. Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

6. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, agregar 500 µl de tampón AW2 y centrifugar durante 3 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm). Desechar el tubo de flujo continuo y el tubo de recolección.

7. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.

8. Eluya el ADN agregando 200 µl de tampón AE al centro de la membrana de la columna de centrifugación. Incube durante 1 minuto a temperatura ambiente (15–25 °C). Centrifugue durante 1 minuto a ≥6000 x g.

9. Opcional: repita el paso 8 para obtener un mayor rendimiento de ADN.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 2.

Protocolo de Purificación del ADN total de uñas, cabello o plumas mediante extracción manual con el Kit Dneasy Blood & Tissue de Qiagen

Puntos importantes antes de empezar:

Si utiliza el kit de sangre y tejido DNeasy por primera vez, lea las "Notas importantes" en el Manual de sangre y tejido DNeasy.

Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15–25 °C) en una microcentrífuga

La agitación se debe realizar mediante pulsos de agitación durante 5 a 10 s.

Cosas que hacer antes de empezar

Prepare una solución acuosa de ditiotreitol (DTT) 1 M. Conserve alícuotas a –20 °C. Descongele inmediatamente antes de usar.

Los tampones ATL y AL pueden formar precipitados durante el almacenamiento. Si es necesario, calentar a 56 °C hasta Los precipitados se han disuelto completamente

Los tampones AW1 y AW2 se suministran como concentrados. Antes de usarlos por primera vez, agregue la cantidad adecuada de etanol (96-100 %) como se indica en la botella para obtener una solución de trabajo.

Precaliente en un bloque térmico, a 56 °C para usar en el paso 3.

Procedimiento

1.Agregue 300 µl de tampón ATL, 20 µl de proteinasa K y 20 µl de DTT 1 M a 1,5 ml. tubo de microcentrífuga (no incluido).

El DTT se oxida rápidamente en soluciones acuosas y también debe añadirse justo antes de su uso. Conserve la solución madre de DTT (1 M) a –20 °C.

2.Para las uñas, ¡siga el paso 2a; para el cabello, siga el paso 2b; para las plumas, siga el paso 2c.

2a. Uñas: corte la muestra (hasta 10–25 mg) en trozos pequeños y transfiérala al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3. 2b.

2b. Cabello: corte un trozo de 0,5 a 1 cm de la base del cabello y transfiéralo al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3. 2c.

2c. Plumas: corte un trozo de 2 a 5 cm de la pluma (hasta 25 mg) y transfiéralo al tubo de microcentrífuga del paso 1. Cerrar la tapa y mezclar mediante vórtex pulsado durante 10 s. Continúe con el paso 3.

3. Incubar a 56 °C hasta que la muestra esté completamente lisada. Para este paso utilice el bloque térmico a la temperatura indicada usando el modo de agitación para que se agite la muestra durante la incubación aproximadamente a una velocidad aproximada de 300 RPM.

El tiempo de lisis varía según la muestra procesada. En general, los pelos se lisan en 1 hora. Si es más conveniente, que las muestras se pueden lisar durante la noche; esto no las afectará negativamente.

COPIA NO CONTROLADA

Las púas de las plumas permanecerán sin lisar. En el caso de las muestras que contengan púas sin lisar, centrifugue brevemente y transfiera el sobrenadante a otro tubo antes de continuar con el paso 4.

4. Agite en vórtex durante 15 s. Agregue 300 µl de tampón AL a la muestra y mezcle bien mediante agitación en vórtex. A continuación, añadir 300 µl de etanol (96–100 %) y volver a mezclar bien mediante vórtex.

Es esencial que la muestra, el tampón AL y el etanol se mezclen de inmediato y completamente mediante agitación en vórtex o pipeteo para obtener una solución homogénea. El tampón AL y el etanol se pueden mezclar previamente y agregar juntos en un solo paso para ahorrar tiempo al procesar múltiples muestras. Se puede formar un precipitado blanco al agregar el tampón AL y el etanol. Este precipitado no interfiere con el procedimiento DNeasy. Algunos tipos de muestra pueden formar un lisado gelatinoso después de agregar el tampón AL y el etanol. En este caso, se recomienda agitar vigorosamente o mezclar con vórtex la preparación.

5. Pipetee la mezcla del paso 4 (incluido cualquier precipitado) en el centrifugador DNeasy Mini. Columna colocada en un tubo de recolección de 2 ml (incluido). Centrifugar a ≥6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Desechar el líquido de flujo y el tubo de recolección

6. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido), agregue 500 µl de tampón AW1 y centrifugue durante 1 minuto a ≥6000 x g (8000 rpm). Descarte el flujo continuo y el tubo de recolección.*

7. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido), agregue 500 µl de tampón AW2 y centrifugue durante 3 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm) para secar la membrana DNeasy. Descarte el tubo de recolección y el de flujo continuo.

Es importante secar la membrana de la columna de centrifugación DNeasy Mini, ya que el etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores. Este paso de centrifugación garantiza que no quede etanol residual durante la siguiente elución.

Después del paso de centrifugación, retire la columna de centrifugación DNeasy Mini con cuidado para que no entre en contacto con el flujo, ya que esto provocaría un arrastre de etanol. Si se produce arrastre de etanol, vacíe el tubo de recolección y luego reutilícelo en otra centrifugación durante 1 minuto a 20 000 x g (14 000 rpm).

8. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml o 2 ml (no incluido) y pipetee 200 µl de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego centrifugue durante 1 minuto a ≥6000 x g (8000 rpm) para eluir. La elución con 100 µl (en lugar de 200 µl) aumenta la concentración final de ADN en el eluido, pero también disminuye el rendimiento general de ADN (consulte el Manual de sangre y tejidos DNeasy).

9. Recomendado: Para obtener el máximo rendimiento de ADN, repita la elución una vez como se describe en el paso 8. Se puede utilizar un nuevo tubo de microcentrífuga para el segundo paso de elución a fin de evitar la dilución del primer eluído. Como alternativa, para combinar los eluidos, se puede reutilizar el tubo de microcentrífuga del paso 8 para el segundo paso de elución.

Nota: No eluya más de 200 µl en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml porque la columna de centrifugación DNeasy Mini entrará en contacto con el eluído. Este paso conduce a un mayor rendimiento general de ADN.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 3.

Extracción manual con el Kit DNeasy Plant Mini de Qiagen

Notas antes de comenzar

- Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Si es necesario, vuelva a disolver los precipitados en los concentrados de tampón AP1 y tampón AW1.
- Agregue etanol a los concentrados de tampón AW1 y tampón AW2.
- Precaliente un baño de agua o un bloque de calentamiento a 65 °C.
- Utilice micropipetas o la pipeta electrónica de dispensador múltiple y sus jeringas combitips, dependiendo de la cantidad que vaya a pipetear y si debe pipetear el mismo reactivo en la misma cantidad en varios tubos.

1. Romper las muestras (≤100 mg de peso húmedo o ≤20 mg de tejido liofilizado) utilizando el equipo para macerar muestras "TissueLyser II" o, alternativamente, realizar la disgregación manual con el micropistilo dentro del mortero o en caso necesario, introducir el micropistilo directamente en el mismo tubo Eppendorf que contiene la muestra. También se puede utilizar como alternativa el nitrógeno líquido con su guante criogénico.

Nota: Según el tamaño de la muestra, para poder manipularla mejor, a veces se requiere colocar la misma en Placas Petri.

2. Agregue 400 µl de tampón AP1 y 4 µl de ARNasa A. Mezcle en vórtex e incube utilizando el bloque térmico durante 10 min a 65 °C, usando el modo de agitación para que se agite la muestra durante la incubación.

Nota: No mezcle el tampón AP1 y la ARNasa A antes de usar.

3. Agregue 130 µl de tampón P3. Mezcle e incube durante 5 minutos en hielo.

4. Recomendado: centrifugue el lisado durante 5 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm).

5. Pipetee el lisado en una columna de centrifugación QIAshredder colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugue durante 2 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm).

6. Transferir el líquido de filtración a un tubo nuevo sin alterar el sedimento, si lo hubiera. Añadir 1,5 volúmenes de tampón AW1 y mezclar mediante pipeteo.

7. Transferir 650 µl de la mezcla a una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar durante 1 min a ≥6000 x g (≥8000 rpm). Desechar el líquido de filtración. Repetir este paso con la muestra restante.

8. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo de 2 ml. Añadir 500 µl de tampón AW2 y centrifugar durante 1 min a ≥6000 x g (≥8000 rpm). Desechar el líquido de filtración.

9. Añadir otros 500 µl de tampón AW2. Centrifugar durante 2 min a 20 000 x g (14 000 rpm).

Nota: Retire la columna de centrifugación del tubo de recolección con cuidado para que no entre en contacto con el líquido filtrado a través de la misma.

10. Transfiera la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.

COPIA NO CONTROLADA

11. Agregue 100 µl de tampón AE para la elución, previamente calentado. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C). Centrifugue durante 1 minuto a ≥6000 x g.

12. Repita el paso 11, en caso de considerarlo necesario para mejorar la extracción

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 4.

Extracción APEX, kit para tejidos MagMax

A continuación, se indican los pasos para el programa del kit para tejidos de extracción llamado MagMAX CORE, a reacción parcial (llamado MagMAX_CORE_Heated:V2 en el sistema del equipo), utilizado directamente con tejidos o bien con aplicadores con sangre. Para los datos de la reacción completa ver el cuadro al final de este anexo.

Preparación de la muestra:

Primero tome una pequeña cantidad de la muestra, esto según el inserto del kit es entre 20-30mg de tejido, pero depende del tipo de tejido y condiciones de este, por lo que se recomienda que en un tubo de microcentrífuga la muestra cubra solamente la parte inferior de un tubo de microcentrífuga de 1.5mL.

Nota: Según el tamaño de la muestra, para poder manipularla mejor, a veces se requiere colocar la misma en Placas Petri.

Nota: Evite colocar mucha muestra pues el objetivo es que está quede en contacto con alrededor de 100uL del siguiente punto.

A cada tubo de microcentrífuga coloque 90uL de PBS y 10uL de MagMAX CORE proteinasa k (20mg/mL). Esta mezcla puede ser preparada previamente para el conjunto de tubos que se va a preparar o bien dispensar los volúmenes directamente en cada tubo.

Nota: Utilice micropipetas o la pipeta electrónica de dispensador múltiple y sus jeringas combitips, dependiendo de la cantidad que vaya a pipetear y si debe pipetear el mismo reactivo en la misma cantidad en varios tubos.

Nota: Para aplicadores con sangre utilice 200 de PBS con 10 de PK. Además, en caso de contar con sangre líquida no es necesario agregar PBS, únicamente se usan 200ul de sangre con 10ul de proteinasa K.

Coloque cada uno de los tubos a incubar por dos horas a 55°C en un bloque térmico a una velocidad aproximada de 300 RPM. Según el tipo de tejido puede considerar variar el tiempo de incubación inclusive dejarlo toda la noche, recuerde que la incubación termina oficialmente cuando el tejido se ha lisado por completo (la solución se vuelve clara o homogénea). Mientras pasan las horas de incubación inicie la preparación de las placas plásticas del APEX.

Preparación de las placas de trabajo

Prepare las 5 placas plásticas que requiere el proceso:

- Placa de muestra (profunda o deepwell)
- Placa de lavado 1 (profunda o deepwell)
- Placa de lavado 2 (profunda o deepwell)
- Placa de elusión (estándar)
- Placa de puntas (estándar, con puntas para deepwell)

Nota: Se pueden reutilizar plásticos usados, por lo que cada una de estas debe rotularse adecuadamente como "Muestras", "Lavado 1" etc. Solo se usan los espacios no utilizados

COPIA NO CONTROLADA

anteriormente, solo debe dejar al menos un espacio entre la última línea utilizada y la nueva línea a que se va a utilizar. Además, se recomienda verificar que la placa de muestras reutilizada no permanezca con residuos solidificados para evitar un mal funcionamiento del APEX.

Preparación de reactivos para cada placa:

Placa de muestra

Prepare una mezcla por separado, por cada muestra la solución debe tener:

- 10uL de MagMAX CORE Magnetic Beads. O 20uL
- 175uL de MagMAX CORE Lysis Solution
- 175uL MagMAX CORE Binding solution

Nota: Se recomienda preparar al menos 1 solución adicional a la cantidad de muestras que se están trabajando. Si se trabajan más de 10 muestras se recomiendan 2 soluciones adicionales.

Nota: Tenga presente que agitar brevemente en un Vortex la solución antes de pipetear, ya que los Magnetic Beads se precipitan al dejar la solución en reposo.

- Tome 360ul de la solución preparada y colóquela en cada uno de los pocillos de la placa que va utilizar.
- Luego de las dos horas de incubación de las muestras, centrifugue brevemente cada tubo y tome 100ul de cada muestra y coloque en los pocillos de la placa que va a utilizar.

Nota: No siempre quedan los 100ul en cada tubo, en ese caso tome la mayor cantidad posible.

Nota: Rotule con un marcador indeleble los pocillos utilizados de la placa.

COPIA NO CONTROLADA

Reactivo	Reacción parcial	Reacción completa
Preparación de muestra:		
PBS	0uL o 90uL o 200uL*	0uL o 90uL o 200uL*
MagMAX CORE proteinasa k	10 uL	10 uL
Placa de muestra:		
MagMAX CORE Magnetic Beads	10uL	20uL
MagMAX CORE Lysis Solution	175uL	350uL
MagMAX CORE Binding solution	175uL	350uL
Placas de lavado 1 y 2 (respectivamente):		
MagMAX CORE Wash Solution 1	275uL	500uL
MagMAX CORE Wash Solution 2	275uL	500uL
Placa de elusión:		
MagMAX Elution Buffer	50uL	90uL
Placa de puntas		
No contiene reactivos		

*Estos volúmenes dependen del tipo de muestra que se procesó, ver información en indicada anteriormente en este mismo anexo.

Finalmente proceda a utilizar el programa del equipo de acuerdo a como se indica en el procedimiento.

Anexo 5.

Procedimiento para preparar algunas muestras

Pelos

1. Verificar la longitud del pelo.
2. Si el pelo mide más de 1cm, cortar un fragmento de aproximadamente 1cm desde el extremo más cercano a la raíz.
3. Identificar la raíz utilizando un estereoscopio; en su defecto, orientarse observando las escamas.
4. Seleccionar de 3 a 5 pelos por muestra, cuando sea posible según la cantidad recibida y cuando se sospeche que sean del mismo individuo.
5. Introducir todos los fragmentos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 µL.
6. Continuar con el protocolo de extracción automatizada en el equipo KingFisher APEX.

Plumas

1. Cortar un fragmento de aproximadamente 2 cm del raquis, tomando la porción más cercana a la raíz de la pluma.
2. Si las plumas son muy pequeñas, utilizar de 2 a 4 plumas por muestra (mientras más pequeña usar 4, de tamaños medianos usar 2).
3. Introducir todos los fragmentos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 µL.
4. Continuar con el protocolo de extracción automatizada en el equipo KingFisher APEX.

Huevos

1. Verificar el estado de la muestra.
2. Si el huevo está completo, partirlo por la mitad.
3. Con un aplicador, tomar una pequeña cantidad de tejido adherido a las paredes internas.
4. Si solo se dispone de un fragmento de huevo, repetir el procedimiento sobre la cara interna del mismo.
5. Realizar dos cortes en caras distintas del aplicador.
6. Introducir los fragmentos cortados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 µL.
7. Continuar con el protocolo de extracción automatizada en el equipo KingFisher APEX.

Heces

1. Con pinzas o tijeras (según la textura de la muestra), tomar la cantidad indicada por el kit de extracción a utilizar.
2. Procurar obtener la muestra de la parte externa de los extremos de las heces.
3. Introducir la cantidad recolectada en un tubo de microcentrífuga de 1,5 µL.
4. Continuar con el protocolo de extracción automatizada en el equipo KingFisher APEX.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 6.

Verificaciones de equipos críticos

1. Verificación del APEX
   - La misma se debe realizar después de cada mantenimiento o cada 6 meses
   - La misma consiste en montar 2 muestras con resultado positivo conocido (se pueden utilizar algunas de las muestras usadas en la validación) con su respectivo control negativo

2. Verificación del Nanodrop
   - La misma se debe realizar después de cada mantenimiento o cada 6 meses
   - La misma consiste en montar 2 muestras con resultado positivo conocido (se pueden utilizar algunas de las muestras usadas en la validación), más el control positivo y negativo respectivo

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 7

Levantamiento de elementos pilosos y Análisis por Kastle-Meyer

A. Levantamiento de elementos pilosos

1. Búsqueda

- Usar el equipo de protección personal y cubrir la mesa de trabajo con papel blanco
- Realizar inspección del indicio mediante barrido con luz rasante.
- Apoyarse con lupas de magnificación cuando sea necesario.
- Examinar toda la superficie (interna y externa) del objeto o prenda según el caso.

2. Recolección

- Levantar los elementos con pinzas metálicas con puntas recubiertas de goma, o tomarlos directamente con la mano, protegida con guantes.
- Se pueden recolectar elementos independientemente de su longitud.

3. Embalaje

- Colocar cada elemento en pseudosobres de papel individuales
- Se deben de separar por indicio.
- Introducir luego en un sobre de papel manila individual y finalmente en otro sobre agrupando todos los elementos recolectados del mismo caso.

4. Resultados

- Los resultados del levantamiento de estos elementos se registran en el SADCF en el proceso de Datos y Resultados correspondiente, seleccionando una de las siguientes opciones:
    - Levantamiento de elementos pilosos:
        - **Positivo**: Cuando se encuentra al menos un elemento piloso para análisis.
        - **Negativo**: Cuando no se encontraron elementos pilosos para ser analizados.
    - Si no aplica dicho levantamiento, se debe seleccionar la opción de "No se realiza" en "Encargado(a).

COPIA NO CONTROLADA

B. Técnica de Kastle-Meyer (detección presuntiva de sangre)

1. Preparación inicial

- Usar el equipo de protección personal y cubrir la mesa de trabajo con papel blanco
- Utilizar material estéril y limpio por muestra, la limpieza de tijeras y pinzas entre cada muestra de un mismo indicio puede ser realizada con DNA Away y luego con alcohol 70%.
- Los reactivos se almacenan en refrigeración, por lo que debe sacarlos algunos minutos antes para que se atemperen.
- Agrupar las manchas observadas y rotular sobre el indicio el área de la muestra a trabajar, tomar una fotografía donde se observe cada una de las muestras a trabajar.

Nota: En la búsqueda de sangre no existe un criterio de muestreo establecido con respaldo científico, por lo tanto, se hace una selección de las muestras y no un muestreo. En esta selección generalmente se levanta el 100% de las muestras por medio de un agrupamiento de las manchas observadas, basado en la historia del caso, las características y distribución de las manchas. En estos casos si se deja una mancha en la prenda sin levantar es porque se considera que su origen es el mismo a alguna de las ya levantadas.

- Tomar pequeños recortes de la muestra seleccionada y proceda con las indicaciones del punto 2 y 3 de este anexo.

Nota: Si las muestras corresponden a tejidos absorbentes, proceda a recortar el fragmento correspondiente utilizando tijeras limpias. En caso de que los indicios sean de superficies no absorbentes, efectúe la recolección utilizando dos aplicadores: uno humedecido con una o dos gotas de agua destilada estéril, y otro completamente seco.

Nota: Los reactivos deben de utilizarse antes de la fecha de vencimiento, sin embargo, se pueden utilizar reactivos posteriores a su fecha de vencimiento, de manera excepcional, siempre que los controles positivo y negativo produzcan resultados aceptables. Si los resultados obtenidos en el análisis de los controles no son adecuados, no debe utilizar estos reactivos, desecharlos adecuadamente y proceder a utilizar reactivos sin vencer

2. Trabajar controles

- Preparar pruebas de controles, la prueba se realiza como se indica en el punto 3 de este anexo, y siempre se debe preparar antes de las muestras:
    - Control positivo (sangre): debe virar a magenta
    - Control negativo: no debe cambiar de color

Nota: Los controles se montan una vez por caso, sin embargo, si este análisis se extiende por más de un día, realizar los respectivos controles cada día de análisis.

Nota: Si se obtiene un resultado distinto se debe descartar reactivos y repetir.

Nota: La descripción de la preparación de los controles, así como los reactivos, se debe realizar de acuerdo al Procedimiento para la Búsqueda, Levantamiento, Análisis, Embalaje y Conservación de Elementos Traza

COPIA NO CONTROLADA

3. Procedimiento:

- Tomar un fragmento del control o muestra, con pinzas limpias y colóquelo sobre papel filtro o papel tipo "Kimwipe ™"
- Añadir de una a tres gotas de etanol 95%.
- Añadir dos gotas de fenolftaleína y esperar aproximadamente 10 segundos. Verificar que no ocurra un cambio de color. Si se observa un cambio de color, descartar los reactivos y utilizar reactivos nuevos.
- Añadir una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
- **Resultados** según la evaluación del cambio de color
    - **Positivo**: implica la aparición de color magenta en la prueba.
    - Positivo débil: implica la aparición de un color magenta débil, u otra coloración sospechosa en la prueba, esto en comparación con la intensidad del control positivo. (Este resultado se reporta como un positivo en el cuadro de resultados).
    - **Negativo**: si transcurridos aproximadamente 30 segundos no se observa ningún viraje de color a magenta.
- Los resultados y los datos de los controles se registran en el proceso de Datos y Resultados dentro del SADCF de la siguiente forma:
    - Búsqueda aparente sangre: Catálogo de opciones seleccionable entre: "No se observa", "No apto" y "Si, ver Positivo/Negativo".
    - Kastle-Meyer (Positivo): Espacio en blanco donde el analista coloca la rotulación de las muestras con resultados Positivos, como, por ejemplo: M1, M2 a M4 y M6
    - Kastle-Meyer (Negativo): Espacio en blanco donde el analista coloca la rotulación de las muestras con resultados Negativos, como, por ejemplo: M3, M5 y M8 a M9
    - Si no aplica dicho análisis, se debe seleccionar la opción de "No se realiza" en "Encargado(a).

Nota: Si el tamaño de la muestra es muy pequeño y realizar la prueba de Kastle-Meyer puede agotar la muestra, no se realiza esta prueba y se puede trasladar directamente al proceso de extracción.

Nota: Se debe tomar una fotografía con la información de los reactivos utilizados en este proceso.

Nota: Siempre se debe realizar una fijación fotográfica de los resultados obtenidos. Las muestras con resultado positivo débil deben continuar con el análisis por ADN no humano.

4. Manejo de muestras

- Positivos y Positivo débil: se marcan y se conservan para los análisis posteriores.
    - Si eventualmente se obtiene un resultado negativo en los análisis posteriores se traslada a destrucción
- Negativos: no se levantan y se trasladan para destrucción.

COPIA NO CONTROLADA