Elaborado o modificado por:	**Revisado por Líder Técnico:**
Dra. Ingrid Sanou Karlson **Profesional en Genética Forense,** **Sección de Genética Forense**	**Dra. Anayanci Rodríguez Quesada** **Profesional en Genética Forense.** **Líder Técnico Sección de Genética Forense**
Visto Bueno Encargado de Calidad:	**Aprobado por:**
Dr. Alejandro Hernández Bolaños **Profesional en Genética Forense.** **Encargado de Calidad de la Sección de Genética Forense**	**Dra. Eugenia Fernández Mora** **Jefatura Sección de Genética Forense**

COPIA NO CONTROLADA

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	2015.10.30	11/07/2016	Versión Inicial del Procedimiento		EFM
02	11/07/2016	22/03/2017	Revisión y cambio en el formato	07-2016	EFM
03	22/03/2017	15/06/2017	Lista de chequeo	27-2017	EFM
04	15/06/2017	18/07/2017	Revisión y edición	53-2017	EFM
05	18/07/2017	14/06/2018	Revisión y edición	64-2017	EFM
06	14/06/2018	03/02/2021	Revisión y edición	11-2018	EFM
07	03/02/2021	05/04/2024	Se agrega uso de Termomixer en paso de incubación. Eliminan equipos no utilizados	05-2021	EFM
08	05/04/2024	20/02/2025	Revisión y edición	08-2024	EFM
09	20/02/2025		Cambio de nombre de Sección	07-2025	EFM

COPIA NO CONTROLADA

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:

Extraer ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizando Chelex al 5%.

2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para extraer ADN a partir de diferentes tipos de evidencias remitidas a la Sección de Genética Forense utilizando la resina Chelex al 5%

COPIA NO CONTROLADA

3 Referencias:

- Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD. 1989. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplification: A forum for PCR users, 11.
- Amplitype User Guide. 1992. Versión 2. Perkin Elmer.
- Armed Forces Institute of Pathology/ American Registry of Pathology. 1996. Bloodborne Pathogen Exposure Control Plan.
- Barrantes, M. 2001. Bioseguridad. Curso Salud Ocupacional.
- Coastal Healthcare. 1992. Bloodborne Pathogens. Virginia Beach, Va. USA.
- Armed Forces DNA Laboratories. 1996. Chelex DNA Extraction.
- National Research Council. 1989. Biosafety in the Laboratory. Prudent Practices for the Handling and Disposal of Infectious Materials. National Academy Press. Washington, D. C.
- Walsh, P et al. 1991. BioTechniques 10: 4, 506-513
- Stricoff, R. S.1995. Handbook of Laboratory Health and Safety. Wiley Interscience Publications. USA.
- Technical Working Group on Crime Scene Investigation. 2000. Crime Scene Investigation: A guide for Law Enforcement. U.S. Department of Justice. USA.
- Technical Working Group on Crime Scene Investigation. 2000. Crime Scene Investigation: A guide for Law Enforcement. U.S. Department of Justice. USA.

4 Equipos y Materiales:

- Agitador tipo Vortex de 3 velocidades o similar.
- Autoclave capaz de generar 121 °C y 1,2 Kg 7 cm3 de presión o similar.
- Balanza granataria marca Mettler Toledo PB-3002S, capacidad 3100,00 ± 0,01g o similar.

- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, color rojo, tamaño 8,5” x 11”, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, no punzocortante.
- Botella estéril de 250 mL con tapa con barra magnética autoclavable o similar *
- Cinta para autoclave.
- Cubreboca desechable (mascarilla)
- Cubrecabeza o Gorro desechable.
- DNA IQ Spin basket Promega referencia V1221 o similar, nuevos y estériles. (canasta para tubos de 1,5 mL)
- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Extracción de ADN con Chelex al 5%: Sección de Genética Forense.
- Formulario: Entrega de muestras para cuantificación.
- Gabacha desechable.
- Guantes desechables.
- Marcador con tinta indeleble.
- Microcentrífuga (rango 0-14.000 r.p.m.) o similar.
- Micropipeador ajustable de 20 -200 µL y de 100 -1000 µL**
- Papel toalla desechable.
- Pinzas metálicas **
- Pizeta con etanol al 70%.
- Probeta 100 mL, o similar*
- Puntas para micropipeta de 1-100 uL, 200-1000 uL
- Refrigerador de temperatura cercana a los 4º C (Rango entre 2-8º C), para preservar el control biológico. Se debe de dar seguimiento a las temperaturas de la misma mediante un Termómetro digital calibrado/ verificado.
- Tijera metálica**
- Termómetro digital calibrado/ verificado
- Termómetro (rango 0-100 C o similar) con divisiones de 1º C
- Thermomixer marca Eppendorff o similar
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL

Nota 1: Las puntas de micropipeta y los tubos para microcentrífuga deben ser nuevos y autoclavados. (Ver Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado).

COPIA NO CONTROLADA

* Para su lavado: utilice Detergente Terg-A-Zyme al 1 % y posteriormente enjuague con agua de tubo eliminando rastros de jabón (como mínimo tres veces); enjuague con agua tipo Milli-Q o similar, y/o limpie el material reutilizable con Solución de descontaminación DNAway o etanol al 70%. Deje escurrir sobre papel absorbente y al encontrarse seco, prepare el material para el proceso de esterilización. (Ver Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado)

**Para su limpieza y descontaminación se utiliza DNAway y etanol al 70% y se colocan a secar sobre papel toalla desechable.

COPIA NO CONTROLADA

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Los reactivos deben ser preparados según procedimiento de preparación de reactivos (Ver anexo número 01)

- Agua tipo Milli-Q o similar estéril (ver Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado).
- Agua de tubo.
- Chelex, grado biología molecular Sigma C-7901 o similar.
- Chelex al 5 % (Ver anexo número 01)
- Descontaminador de ADN y ARN asas, DNA Away, cat 7010 o similar.
- Detergente Terg-A-Zyme al 1 % (Ver Anexo Número 1)
- Detergente Terg-A-Zyme, Marca Alconox o similar.
- Etanol al 95 % grado reactivo.
- Etanol al 70 % grado comercial (Ver Anexo Número 01)

6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento de extracción debe realizarse en las áreas designadas para la extracción de ADN de la Unidad de Genética Forense (pre amplificación), de la Sección de Genética Forense.

Para minimizar la posible contaminación por sudor del analista, se recomienda trabajar, de ser posible, en áreas para análisis con aire acondicionado. La temperatura de esta área no debe ser registrada.

7 Procedimiento:

Nota 2: Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Extracción de ADN con Chelex al 5%: Sección de Genética Forense como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

7.1 Utilice gabacha, guantes, cubrecabeza y cubrebocas desechables. (las gabachas a utilizar son las definidas para la zona de pre amplificación).

7.2 Limpie la mesa de trabajo y las micropipetas con solución descontaminante de ADN y ARNnasas DNAaway o similar y etanol al 70%.

7.3 Agregue a todos los tubos con las muestras recortadas, un volumen de entre 300 uL hasta un máximo de 1 mL de agua desionizada Tipo Milli-Q o similar estéril. Trate de igual forma el control positivo y el control negativo.

7.4 Incube a temperatura ambiente por al menos 30 minutos y hasta por un máximo de 3 horas.

7.5 Agite en Vortex.

7.6 Centrifugue de 3 a 5 min a una velocidad de 12.000 a 14.000 r.p.m.

7.7 Remueva el sobrenadante dejando aproximadamente 50 uL en cada tubo con cuidado de no resuspender el botón.

7.8 Agregue de 40 a 200 uL de Chelex al 5% (el Chelex sedimenta rápidamente, coloque la botella de Chelex al 5 % en un agitador magnético, tome el volumen requerido con una punta cortada previamente con tijera).

7.9 Agite en vortex. Verifique que las muestras recortadas estén en el fondo del tubo, en caso de que no hayan sido removidas.

7.10 Incube a 56 ºC en Thermomixer o similar por 15-30 min.

7.11 Incube a 100 ºC en Thermomixer o similar, por un periodo entre 8 a 12 minutos.

7.12 Centrifugue brevemente.

7.13 El ADN que está en el sobrenadante puede ya ser cuantificado. Almacene el extracto de 2 a 8 ºC ± 2 ºC. (Ver: Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real)

7.14 Si en 7.6 es necesario remover el soporte por su naturaleza absorbente, por presencia de tierra y/o inhibidores, entre otros, se debe proceder como se indica a continuación:

7.14.1 Traspase con una pinza el soporte del tubo de 1,5 mL a un spin basket y coloque el spin basket con el soporte dentro del tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Limpie la pinza utilizada con descontaminante de ADN y ARNnasas DNAaway o similar y etanol al 70% cada vez que traspase un soporte.

COPIA NO CONTROLADA

7.14.2 Centrifugue en una microcentrífuga todos los tubos por 3 a 5 minutos a una velocidad de 12.000 a 14.000 r.p.m.

7.14.3 Descarte el spin basket con el soporte de los tubos que lo contienen, remueva el sobrenadante dejando aproximadamente 50 uL en cada tubo. Continúe a partir de 7.8.

7.14.4 Proceda a cuantificar la cantidad de ADN mediante PCR tiempo Real (Ver: Procedimiento para la cuantificación de ADN por PCR Tiempo Real y el formulario: Entrega de muestras para cuantificación).

COPIA NO CONTROLADA

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

En esta fase no es posible observar resultados pues las muestras, el control negativo y el control positivo de extracción deben para ello someterse a la cuantificación por PCR en Tiempo Real, amplificación por PCR y separación de fragmentos mediante el uso del analizador genético. (ver Procedimiento de Gestión de Casos e Interpretación de Resultados)

Es una buena práctica que hasta donde sea posible no se compartan los reactivos entre los diferentes peritos para disminuir los riesgos de contaminación, por lo que se recomienda que cada perito cuente con reactivos de uso exclusivo.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

N/A

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Recuerde colocarse la gabacha, cubreboca, cubrecabeza y los guantes antes de manipular las muestras, ya que los fluidos biológicos son fuente potencial de enfermedades.

Proceda a limpiar la mesa de trabajo con descontaminante de ADN y ARNnasas y etanol de 70º C, utilizando toallas de papel desechables, antes y al final de los análisis, sobre todo en aquellas áreas que han estado en contacto con material biológico.

12 Simbología:

- ADN: Acido Desoxirribonucleico
- BQM: Bioquímica
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses
- CAL: Nomenclatura para el aseguramiento de la calidad
- min: minuto
- N/A: No aplica
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- PON: Procedimiento de Operación Normado
- SCD: Solicitud de Cambio Documental
- SGC: Sistema de Gestión de la Calidad
- UGC: Unidad de Gestión de la Calidad
- UGF: Unidad de Genética Forense
- ºC: grados Celsius

COPIA NO CONTROLADA

13 Terminología:

N/A

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos y controles

Anexo Número 01

Preparación de reactivos

Chelex al 5 %

Utilice una balanza granataria para pesar el Chelex.

Pese 5 gramos de Chelex grado biología molecular Sigma C-7901 o similar, en botella de vidrio pirex transparente de 250 mL con tapa, autoclavada con barra magnética y agregue con probeta de 100 mL, en cada caso 100 mL de agua tipo Milli-Q o similar estéril. Guarde a temperatura ambiente.

Este reactivo es estable por tiempo indefinido, a menos que sea contaminado (se observa turbiedad) por lo que debe ser descartado.

Detergente Terg-A-Zyme al 1%

Utilice una balanza granataria para pesar el detergente.

Disuelva 10,00 gramos de detergente Terg-A-Zyme puro en un litro de agua de tubo.

Prepare en el momento del lavado del material, no se debe almacenar y debe ser consumido en su totalidad durante el lavado.

ETANOL AL 70%

Agregue 737 mL de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y afore a 1 L de agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril en un balón aforado estéril. Guarde en botella de vidrio estéril y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez

Control positivo

Impregne sangre humana de un(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 2 ó 3 mm^2 con el minisacabocados 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.

Control negativo

Recorte de una tarjeta FTA nueva y sin muestra de sangre, círculos de 3 mm^2 con el minisacabocados y guarde en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL tipo "eppendorf" o similar rotulado como control negativo. Este control se debe almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración.

COPIA NO CONTROLADA