



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

**PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE
ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO
DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-BIO-41

VERSION: 03

Rige desde: 09/05/2024

PAGINA: 2 de 24

**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

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 3 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

1 Objetivo:

El objetivo de este PON es indicar el procedimiento para realizar la detección de espermatozoides humanos por medio de la tinción del Sperm Hy-liter indicativo de la presencia de semen en casos forenses trabajados en la UCII.

2 Alcance:

Este PON se emplea para verificar o descartar la presencia de semen humano por medio de la detección de cabezas de espermatozoides humanos extractos que provienen a partir de muestras levantadas de los indicios trabajados en la UCII cuando no se tiene un resultado positivo en la prueba presuntiva de semen, sin embargo se tiene resultado de lámpara de luz forense positivo o donde la sospecha de la presencia de semen es muy alta de acuerdo al PON "Búsqueda, levantamiento, análisis, embalaje y conservación de elementos traza". Además este procedimiento es llevado a cabo por parte de los analistas competentes, basados en la validación respectiva y sus resultados publicados en el informe de validación cuya identificación es: 005-BIO-VAL-2022.

3 Referencias:

- Informe de validación para la detección de espermatozoides humanos por medio de microscopía de fluorescencia con el Kit Sperm Hy-Liter
- Hoja de información técnica y protocolos adicionales sugeridos. Sperm Hy-liter™ Express. Independent Forensics. Lombard Il. Mayo, 2021
- Roitt, Ivan et al. 2000. Inmunología. Harcourt, España. Quinta edición
- Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. OMS.1999. 4 edición. Madrid. Publicado en nombre de la OMS por Médica Panamericana. 2001.
- Developmental validation of Sperm Hy- liter™: a specific, sensitive and confirmatory microscopic screening method for the detection of human sperm from Sexual Assault Evidence. Independent Forensics, Lombard Illinois. USA
- Operating Manual Axioscope 5/7/Vario, Carl Zeiss Suzhou Co. Ltd. Jena, Alemania, Mayo 2019.

4 Equipos y Materiales:

- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, no punzo cortante.
- Centrífuga marca "Thermo scientific" o similar, con capacidad para alcanzar 13000 rpm.
- Computadora con acceso a red y al Sistema de Automatización del Departamento de Ciencias Forenses (SADCF). P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad
- Cronómetro o reloj de intervalos que marque minutos y segundos. (rango 0 a 60 minutos)
- Formulario "Registro de controles de Kit de Sperm Hy-liter" (Ver el Gestor documental)
- Cubre cabezas
- Formulario para Reactivos preparados (M-DCF-GCG-JEF-01-R2) (Disponible en el gestor documental).
- Formulario "FORMULARIO DE REVISIÓN Y/O TRASLADO DE EXTRACTOS CONFIRMATORIOS" (P-DCF-ECT-BIO-37-R13).
- Gabacha limpia de tela o desechable.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

- Gradilla para tubos de micro centrifuga limpias.
- Guantes desechables de nitrilo o similares.
- Lapicero.
- Lápiz de grafito.
- Libros de control de uso de la centrifuga, vórtex y thermomixer y microscópio de fluorescencia.
- Marcador con tinta indeleble.
- Mascarilla desechable.
- Micropipetas limpias* con volumen graduable entre los 200 a 1000 uL.
- Micropipetas limpias* con volumen graduable que pueda medir al menos los siguientes 3 uL- 10uL.
- Microscópio de fluorescencia y contraste de fases con filtros DAPI (azul tinte nuclear) y FITC (verdes los espermatozoides), adaptado a una computadora que tenga instalado el software "Infinity capture" o similar.
- Papel toalla desechable o toallas de talles "Kimtech Prep* brand", de Kimberly Clark o simi lares.
- Puntas de 1000, 200 y de 10 uL, nuevas y estériles para micropipetas.
- Porta objetos con dos pocillos de 11mm.
- Recipiente con bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, de color rojo o similar para el descarte de material bioinfeccioso.
- Refrigerador con temperaturas aproximadas a los 4 °C (rango de 2- 8 °C)
- Thermo Mixer marca Eppendorf o similar, con los siguientes parámetros de operación: rango de temperatura de 1 a 100 °C con incertidumbre de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en temperaturas entre 20 y 45 °C y $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en temperaturas fuera del rango anteriormente indicado y frecuencia de mezcla entre 300 y 3000 rpm.
- Toallas desechables tipo "Kimwipes".
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL nuevos y autoclavados.
- Vórtex marca "Fisher Scientific Touch Mixer" Modelo 231 o similar.

*La limpieza de las micropipetas debe ser por la parte externa con DNA away o similar y luego con etanol al 70% cada vez que se vaya a utilizar.

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua tipo Milli -Q o similar
- Control positivo: se utiliza como control positivo una muestra de semen en una dilución de 1/50. (La dilución se hace con agua tipo Milli -Q o similar.)
- Control negativo vigente. (ver registro de los controles)
- DNA away: Solución descontaminante de ADN y ADNasas. (N.º de Cat: 7010 o similar)
- Etanol al 70% grado comercial
- Buffer de fosfatos salino. (PBS)
- Kit de tinción fluorescente Sperm Hy-liter.
- Solución de lavado que viene con el Kit.

Nota 01: los reactivos preparados, aunque se traten de disoluciones, deben ser debidamente rotulados según se establece en, el responsable de esto es la persona asignada de preparar el reactivo, esto cuenta inclusive la solución de lavado que viene con el kit.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

6 Condiciones Ambientales:

Condiciones de trabajo no son críticas para el análisis. La temperatura no es un factor crítico, ya que tanto el manual del microscopio como el inserto de la tinción dicen que se trabaja a temperatura ambiente.

7 Procedimiento:

7.1 Preparación inicial:

7.1.1 Utilice como perito encargado del montaje del análisis: cubre cabezas, guantes, gabacha y mascarilla desechable.

7.1.2 Limpie cuidadosamente la mesa de trabajo con DNA away y luego con etanol al 70% utilizando toallas de papel desechables.

7.1.3 Tome los tubos eppendorf con los extractos de las muestras a analizar y colóquelos en una gradilla de microtubos previamente limpia (ver punto 4 * de este PON). Si los tubos estaban en refrigeración déjelos temperar.

Nota 02: Las muestras o extractos pueden estar en refrigeración o pueden estar afuera ya que son los mismos extractos que fueron utilizados para el análisis de p30 o muestras que únicamente pasan para el análisis de detección de espermatozoides humanos.

Nota 03: Si a estas muestras no es requerido realizarle el análisis de p30, debe de realizarles la revisión como perito encargado de los análisis a los tubos y su rotulación, como se describe en el apartado "Apertura del proceso RAS y revisión" del PON de "Manejo General de casos en la UCII de la Sección de Biología Forense". De lo contrario ya tendrán esta revisión realizada, ya que vienen del análisis previo de p30 y puede pasar directamente a la extracción y tinción con el Sperm Hy-liter™ descrita en el presente procedimiento.

7.1.4 Busque el control positivo y el control negativo de semen para este análisis, los controles son los mismo que se utilizan para los análisis presuntivos de semen.

Nota 04 Los viales con los controles, tanto el positivo como negativo, están en custodia de los peritos encargados y competentes de realizar el análisis. Los controles son preparados según el anexo 03 del procedimiento para la búsqueda, levantamiento, análisis, embalaje y conservación de elementos traza.

7.1.5 Revise los controles y sus fechas antes de utilizarlos, en caso de que no se tenga controles o que estén vencidos, infórmele al encargado de la preparación de los controles para su respectiva preparación.

7.1.6 Revise las fechas de vencimiento de los reactivos y que no se encuentren vencidos, sin embargo, si hay reactivos vencidos, a modo de excepción, puede utilizarlos siempre y cuando los controles y los resultados de estos controles sean aceptables.

7.1.7 En caso de que los resultados de los controles a la hora de utilizar reactivos vencidos no son aceptables, debe de descartarlos y utilizar un reactivo sin vencer.

7.1.8 La información de los reactivos que utiliza para la tinción del Sperm- Hyliter™ debe de registrarse en el proceso de análisis en serie, para esto vaya a la pestaña "Reactivos y materiales"

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 6 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

y ahí en "Tipo de reactivo o material seleccione: "Reactivo o preparación: "corresponde a la fecha de preparación del reactivo que se está utilizando" y la persona responsable de dicha preparación.

7.1.9 Proceda con el montaje de las muestras y los controles, una vez que se terminado la revisión realizada antes de registrar en el RAS y no hay correcciones o si viene directamente después del análisis de p30.

7.1.10 Si el montaje de la tinción con el Sperm Hy-liter es a partir de extractos que provienen del análisis de p30, estos ya tienen PBS, por lo que a partir de aquí continúe como se indica en el punto 7.1.11; si por el contrario, la tinción de Sper Hy-liter se va a realizar en extractos de manera independiente al de p30, debe de agregar al tubo con el recorte de la muestra 500uL de PBS.

7.1.11 Tome el tubo (s) eppendorf con los recortes de las muestras y los controles y con PBS e incúbelos a temperatura ambiente por una hora, realizando eventualmente agitaciones ocasionales o bien en el Thermomixer a la velocidad más baja de agitación.

7.1.12 Una vez pasado el tiempo, tome todos los eppendorf y colóquelos en una gradilla.

7.1.13 Con pinzas limpias y autoclavadas pase el recorte de uno de los eppendorf a un spin basket™, e introduzca de nuevo el Spin- basket™ en el tubo del que tomo el recorte. Haga así con todos tubos, cambiando de pinzas entre tubo y tubo. (tanto de las muestras como de los controles)

7.1.14 Centrifugue a 13000 rpm por 5 minutos aproximadamente.

7.1.15 Descartar el Spin basket con el trozo del recorte.

7.1.16 Del tubo eppendorf, elimine el sobrenadante con la punta de una pipeta, teniendo cuidado de no romper el botón del sedimento que queda en el fondo del tubo.

7.1.17 Re suspender con 100uL de PBS.

7.1.18 Rotule las láminas que tienen marcadas los pocillos de 11 milímetros.

7.1.19 Colocar 10uL de el botón re suspendido en uno de los pocillos de la lámina.

7.1.20 Distribuya la muestra homogéneamente sobre el pocillo y así sucesivamente con todas las muestras.

7.1.21 Coloque un control negativo que haya recibido todo el proceso anterior en un pocillo, pero en otra lámina, debidamente rotulado.

7.1.22 En el otro pocillo de la lámina donde colocó el control negativo, coloque 10uL del control positivo que igualmente haya sido trabajado bajo todo el proceso anterior.

7.1.23 Permita secar la muestra al aire libre, hasta que no se observe residuos de líquido.

7.1.24 Proceda a la tinción del Sperm Hy-liter™, para esto guíese con el anexo 1 de este procedimiento.

7.1.25 Una vez teñidas las láminas, proceda a hacer la observación de estas para el recuento de los espermatozoides.

7.1.26 Ingrese al cuarto de microscopios de la Sección de Biología con la gabacha, en el microscopio de fluorescencia haga la observación de las láminas teñidas con el kit de Sperm- Hy-



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 7 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

liter™, encienda el microscopio y la computadora que tiene conectada al microscopio y abra el programa "Infinity Capture".

7.1.27 Coloque el microscopio en el objetivo desde donde como analista pueda observar de una manera más general la lámina, una vez ahí puede ir cambiando el aumento del lente objetivo según lo considere necesario, coloque primero la lámina con los controles y enfoque el área del borde alrededor del pocillo (área negra). Posiciónese en el filtro que permite observar la fluorescencia del Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (tinte verde que tiñe solamente espermatozoides humanos) esto con el fin de revisar y asegurarse que la tinción se realizó de acuerdo con el procedimiento y fue exitosa, y esta adecuada para la revisión de las diferentes muestras. Luego con esta misma lámina, pase de filtro a DUAL (posición 3) y luego a la posición del filtro llamado DAPI (posición 4) que es el filtro que permite observar la tinción con el anticuerpo unido a ese colorante que tiñe ADN nuclear humano.

7.1.28 En caso de que no se obtengan resultados de los controles aceptables proceda nuevamente a teñir con el mismo kit solamente un juego de controles, para cerciorarse que fue una mala tinción y no que es el kit de tinción lo que está mal. Si después de esta segunda tinción de los controles con el mismo kit se vuelven a obtener resultados no aceptables, proceda a descartar el kit, tome uno nuevo y realice el montaje tanto de muestras como controles. Las muestras serán montadas a partir del extracto que ya este re suspendido en el PBS. Si por el contrario la segunda tinción de los controles tiñó adecuadamente, proceda a teñir nuevamente un montaje de las muestras nuevo, pero con el mismo kit.

7.1.29 Si los resultados de la observación de los controles son aceptables, tome una fotografía de cada uno de los controles, tanto positivo como negativo con el software integrado al microscopio y una vez tomada rotúlela de manera que pueda identificar cual es el control positivo y cual el negativo del montaje observación en curso.

7.1.30 Coloque el portaobjetos con las muestras reales incógnitas de los casos y proceda de la misma manera, utilizando todos los filtros empezando con el FITC, luego pasando al DUAL y luego colocándolo en el DAPI, sabiendo que las cabezas de espermatozoides se deben de observar con todos los filtros (verdes con FITC y azules en DAPI), pero para identificar su morfología y específicamente los espermatozoides, FITC es el que los identifica por especificidad. Observe la lámina completa.

7.1.31 Para confirmar la identificación, utilice los tres filtros además que puede ayudarse del contraste de fase. (Esto es opcional)

7.1.32 Tome tres fotografías del pocillo con el sistema integrado de cámara al microscopio y el programa "Infinity", si la lámina esta positiva tome solamente una fotografía del campo donde se encuentre el (los) espermatozoide (s).

Nota 05: Al tomar las fotografías con la cámara integrada al equipo, asegúrese que el divisor del haz del microscopio está en la posición donde los oculares no estén disponibles al mismo tiempo, para que toda la luz sea recibida por la cámara.

7.1.33 Proceda de esa manera (7.1.29- 7.1.32) con cada una de las muestras a revisar. Cada vez que tome las fotografías de un caso guárdelas ya con la identificación del número de OT y número de muestra correspondiente.

Nota 06: Para más detalle sobre como utilizar el software y el microscopio refiérase al anexo 2 del presente procedimiento.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 8 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

7.1.34 Si por alguna razón el software no esta funcionando y le realiza lo indicado por el proveedor en el punto 4 de la página 10 del anexo 2, entonces llame a otro compañero competente en el análisis y observación en microscopía de fluorescencia y que verifique ya sea la lámina negativa o positiva en el campo que lo está observando.

7.1.35 Si se realizó la verificación de los resultados, se debe de llenar el registro respectivo.

7.1.36 Reporte el resultado de cada muestra como POSITIVO o NEGATIVO según sea el caso, en el SADCF, ya sea en el proceso de datos y resultados o en el RAS del SADCF que contiene los casos trabajados.

7.1.37 Reporte en el espacio que corresponde del SADCF los resultados de los controles como aceptable o no aceptable, según corresponda.

- Aceptable: Control positivo se observan cabezas típicas de espermatozoides de color verde y el control negativo no se observa ni una sola cabeza de los espermatozoides.
- No aceptable: En el control positivo no se observa ni una sola cabeza de espermatozoides teñidas de los colores esperados, en este caso con el filtro FITC deben de observarse de color verde fosforescente. Para el control negativo, se observan cabezas de espermatozoides.

7.1.38 Pase todas las fotografías a una llave o en una carpeta de red donde pueda buscarlas después para poder subirlas al SADCF.

7.1.39 Una vez terminada la observación microscópica, apague el microscopio y anótese en la bitácora de uso.

7.1.40 Descarte las láminas observadas en el basurero de punzo cortantes.

7.1.41 Pase todas las fotografías que extrajo de la computadora donde tomó las fotos y que se encuentran en una llave o una carpeta de red (punto 7.1.38), a formato PDF, esto en grupos según el número de caso y guárdelas en una carpeta intermedia en la computadora hasta que las pueda adjuntar al SADCF, haga lo mismo con las fotografías de los controles.

7.1.42 Una vez en PDF, rotule de cada cuadro o imagen de cada uno de los archivos PDF, adjuntando un cuadro de texto en cada una de las imágenes con la siguiente información:

- Número de identificación OT (202X-00000-BIO)
- Id de la muestra (p.ej. 89000XX-202X, A.ML01)
- "Campo #" (p. ej. Campo 1, Campo 2, etc; según sea el caso) (Si solamente es un campo porque esta positiva la muestra, se coloca la leyenda "Campo 1 positivo")
- Por último, firme el PDF con firma digital en el primer cuadro.

7.1.43 Para el caso de los controles la leyenda a utilizar para la rotulación de las fotografías será:

- "Control Negativo, Fecha de la toma de la fotografía"
- "Control Positivo, Fecha de la toma de la fotografía"
- Se debe de firmar este documento en el primer cuadro.

7.1.44 Una vez reportados los resultados, suba las fotografías al SADCF, ya sea en RAS o en Datos y resultados, para esto vaya a la pestaña que se llama "documentación anexa", si es en RAS seleccione el número de OT que corresponda para incorporar la fotografía de los análisis confirmatorios, selecciones "incorporar" y del desplegable que emerge complete de la siguiente manera:

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

- En tipo de documento: "Ilustraciones"
- En Detalle del documento: Sperm- Hyliter
- En la "Ruta del documento" busque la dirección del documento adjunta (carpeta intermedia donde almacenó temporalmente las fotos al pasarlas del microscopio) y guárdelo haciendo clic sobre el disquete verde.

Nota 07: En caso de que tenga que subir varias fotografías del mismo tipo de análisis con fotografías del mismo caso, entonces en detalle coloque "Sperm" y el consecutivo para identificar cuantas fotos son. Por ejemplo "Sperm-1", "Sperm-2", etc. Para los controles se debe de colocar la leyenda "Tinción Controles Sperm"

7.1.45 Si el peso del PDF supera los 3 Mb, baje la calidad hasta que el peso del archivo sea el permitido para realizar la operación de adjuntarlo al legajo digital del SADCF.

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

Los resultados se aceptan si el control positivo o de tinción se observan las cabezas de los espermatozoides típicas de un color verde fosforescente y además el control negativo no se observa nada o ninguna cabeza de espermatozoide.

Si el control ya sea positivo o negativo no tienen el resultado esperado con lo descrito en párrafo anterior, proceda a montar de nuevo cada una de las muestras a partir del botón re suspendido en PBS.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

Los resultados del análisis para la determinación de los espermatozoides humanos por medio de la tinción del Sperm Hy-liter, deben de reportarse en un proceso de Datos y resultados generado en el SADCF para el número de OT respectivo, o bien si es un montaje que se hizo en lote en el proceso RAS, reporte el resultado desde esta funcionalidad teniendo cuidado de seleccionar correctamente el número de OT y luego recuerde ir y finalizar el proceso de Datos y resultados respectivo.

Los resultados se reportan como: *Positivo* si se observan cabezas típicas o *Negativo* si no se observa ni una sola cabeza de espermatozoides en toda la lámina.

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Recuerde colocarse la gabacha, la mascarilla y los guantes antes de manipular las muestras para prevenir la contaminación de estas como del analista.

De igual forma los fluidos biológicos impregnados son fuente potencial de enfermedades por lo tanto deben de manipularse según las normas establecidas en este Procedimiento y las reglas básicas de un laboratorio bioseguridad tipo 1 y buenas prácticas de laboratorio.

Es importante usar todas las barreras de protección para evitar la contaminación de las muestras con fragmentos de piel o con saliva del analista.

12 Simbología:

No aplica

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 10 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

13 Terminología:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

DAPI: 4',6 diamino-2-fenilindol

FITC: Isotiocianato de Fluoriceina (siglas en inglés)

RAS: Registro de análisis en serie

OT: Orden de trabajo

PBS: Buffer o Solución tampón de fosfatos salino.

PON: Procedimiento de operación normado


SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Protocolo de Tinción del Sperm- Hyliter ®
2	Tablas de Volúmenes para los diferentes pocillos.
3	Protocolo para rápida detección de esperma en 5 fáciles pasos.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 11 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41

Anexo 1: Protocolo de Tinción del Sperm- Hyliter ®



SPERM HY-LITER™ Express

Protocolo de tinción

Soluciones incluido en el botiquín:

Solución FIXATIVE	Botella tapa de blanca
Solución SAMPLE PREPARATION	Botella tapa de amarilla (se requiere añadir DTT antes de usar)
Solución BLOCKING	Botella tapa de roja
Solución SPERM HEAD STAINING	Botella tapa de verde
Medio de montaje MOUNTING	Botella tapa de azul
Stock de Buffer de lavado 10X	Botella rectangular de 250 mL (obligatorio diluir antes de usar)

*Use este protocolo solamente con las soluciones de SPERM HY-LITER™ Express; No sustituya los reactivos incluidos en el kit.

Se puede usar **SPERM HY-LITER™ Express** con diferentes tipos de portaobjetos (laminillas). A continuación, se muestran las especificaciones del número de gotas de solución que se debe usar con los diferentes tamaños de pocillos de los portaobjetos. El volumen de solución es proporcional al tamaño del pocillo del portaobjetos. **Use el número indicado de gotas para cada paso del protocolo** (con la excepción de la solución para preparación de muestra "Sample Preparation" que más adelante se describe).

Diámetro de los pocillos del portaobjetos	6 mm	8 mm	11 mm	Frotis
IFI cat#	9106-25/26	9408-25/26	9111-25/26	9000-25/26 o portaobjetos regular
# gotas usado para cada pocillo	1	1	2	6-12 (use suficiente para cubrir la muestra)

Determinación de la configuración del portaobjetos: Determine el diámetro del pocillo del portaobjetos y use el número de gotas de la solución apropiado.

En el caso de muestras de frotis, se debe de aplicar una barrera hidrofóbica alrededor del área a teñir. Presione la punta de ImmEdge Pen™ en la pared interna de un tubo microcentrifuga para liberar un poco de la solución (100 µL para cada mancha es suficiente). Usando una punta de pipeta*, coloque el reactivo de la ImmEdge Pen™ para delimitar muestra del frotis. Deje secar antes de teñir. *Nota: para prevenir contaminación entre las muestras, use una punta de pipeta nueva para cada de las muestras.


Soluciones a preparar antes de teñir:

1X Buffer de lavado
Prepare 1X de buffer de lavado de la solución de 10X: diluya 1:10 con DD H₂O en una botella diseñada para lavar a chorro (piseta).

Solución de "Sample Preparation" + DTT
Preparé la solución de "Sample Preparation" y DTT cada día antes de usarlas: Calcule el número de gotas necesario para el numero de pocillos a teñir (use de referencia la tabla en la parte superior). Preparé el DTT de acuerdo a la "Receta de Solución de DTT" descrito al final de la siguiente página. Se ha observado que aumentando la cantidad de DTT, se puede producir una señal fluorescente mayor en muestras con una tinción débil. Para una tinción óptima con **SPERM HY-LITER™ Express** se recomienda una proporción de **10X DTT (5 µL de 1M DTT por gota de solución "Sample Preparation")**.

Procedimiento:

A. Preparación de soluciones:
Preparé 1X de buffer de lavado y solución de "Sample Preparation" + DTT



Independent Forensics
DNA TESTING & TECHNOLOGIES

NOT FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE
SPA SH Express Protocol v 05 31 17

500 Waters Edge, Ste. 210
Lombard, IL 60148
www.ifi-test.com

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 12 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41

B. Ejecute los 5-pasos del protocolo de tinción usando los volúmenes indicados por la configuración del portaobjetos.

1. Fijación: Añada la solución de **FIXATIVE (botella de tapa blanca)** a cada pocillo del portaobjetos. Incube a temperatura ambiente por 10 minutos.
 - a. **Lavar:** Usando una botella de lavado, enjuague *suavemente* cada pocillo del portaobjetos con aproximadamente 2-3 mL de 1X buffer de lavado. No se requiere ni recomienda un lavado riguroso. Después de lavar, use una porción de una toalla de papel para secar el fluido residual en el pocillo del portaobjetos.
2. Preparación de muestra (Sample Preparation): [*Hay que añadir DTT a esta solución antes de usar! Refiérase a la sección de "Soluciones a preparar antes de teñir"*]. Use una pipeta para transferirla solución de **SAMPLE PREPARATION + DTT** a cada pocillo del portaobjetos. El volumen de Sample Preparation y DTT se determinarán de acuerdo al portaobjetos usado. Use la siguiente tabla para usar volumen correcto:

Tamaño del pocillo del portaobjetos	6 mm	8 mm	11 mm	Frotis
Volumen SAMPLE PREPARATION + DTT	~20 µL	~40 µL	~80 µL	240 – 320 µL

Incube a temperatura ambiente por 15 minutos

Lavar: Lave la muestra cómo se describió anteriormente.

3. Bloquear: Añada la solución de **BLOCKING (botella de tapa roja)** a cada pocillo del portaobjetos. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.

Lavar: Lave la muestra cómo se describió anteriormente.

4. Teñir: Añada la solución **SPERM HEAD STAINING (botella de tapa verde)** a cada pocillo del portaobjetos. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.

Lavar: Lave la muestra cómo se describió anteriormente.

5. Montaje: Añada una gota de la solución de **MOUNTING MEDIA (botella de tapa azul)** a cada pocillo del portaobjetos (use tres gotas para frotis). Coloque cuidadosamente un cubreobjetos (proveídos en el kit) por encima de cada pocillo. Usando una porción doblada de toalla de papel, presione gentilmente el porta-cubreobjetos para eliminar el exceso de solución de montaje. El medio de montaje se semi-endurecerá después de 20 minutos a temperatura ambiente*. Puede utilizar esmalte de uñas en los bordes del cubreobjetos para estabilizar la muestra. Se puede visualizar las diapositivas inmediatamente y son estables por días.

*La humedad y el calor puede retardar y/o prevenir el endurecimiento del medio de montaje. Estas condiciones no afectan la calidad de la tinción.

C. Visualice:

Se debe visualizar las muestras teñidas usando un microscopio fluorescente con los filtros apropiados. Los núcleos celulares, incluyendo los de células epitelial y espermáticas, se puede visualizar usando filtros compatibles con DAPI. Las cabezas de los espermatozoides humanos se visualizan usando filtros compatibles para fluoresceína o Alexa 488. Las muestras se pueden visualizar usando objetivos de 10x, 20x, 40x o 100x, esto queda a discreción del analista.

Receta de Solución de DTT

Volumen final:	1 mL	10 mL	100 mL
DTT	0.154 g	1.54 g	15.4 g
H ₂ O	~0.7 mL	~7 mL	~70 mL
1 M KOH	0.11 mL	1.1 mL	11 mL

Confirme la solución DTT final tenga un ~pH 8.0. Añade DDH₂O al volumen final indicado, haga alícuotas y congele. Se puede congelar y deshelar alícuotas dos veces antes de desecharlas.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 13 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

Anexo 2: Tablas de Volúmenes para los diferentes pocillos.

Table 1: Solution Volumes for Extract Slides and SPERM HY-LITER™ and SPERM HY-LITER™ EXPRESS

Volumes for 11 mm slide wells

# of wells	White Cap	Yellow Cap	Red Cap	Green Cap
	No. Drops Fixation	No. Drops Sample Prep* / Vol DTT	No. Drops Blocking	No. Drops Staining
1	2	2 drops / 10 µL (80 µL)	2	2
2	4	4 drops / 20 µL (160 µL)	4	4
3	6	6 drops / 30 µL (240 µL)	6	6
4	8	8 drops / 40 µL (320 µL)	8	8
5	10	10 drops / 50 µL (400 µL)	10	10
6	12	12 drops / 60 µL (480 µL)	12	12
7	14	14 drops / 70 µL (560 µL)	14	14
8	16	16 drops / 80 µL (640 µL)	16	16
9	18	18 drops / 90 µL (720 µL)	18	18
10	20	20 drops / 100 µL (800 µL)	20	20

*Sample prep solution requires indicated volume of DTT added to indicated number of drops. Final volume (in parenthesis); place 80 µL of solution on sample well.

Volumes for 8 mm slide wells

# of wells	White Cap	Yellow Cap	Red Cap	Green Cap
	No. Drops Fixation	No. Drops Sample Prep* / Vol DTT	No. Drops Blocking	No. Drops Staining
1	1	1 drops / 5µL (40 µL)	1	1
2	2	2 drops / 10 µL (80 µL)	2	2
3	3	3 drops / 15 µL (120 µL)	3	3
4	4	4 drops / 20 µL (160 µL)	4	4
5	5	5 drops / 25 µL (200 µL)	5	5
6	6	6 drops / 30 µL (240 µL)	6	6
7	7	7 drops / 35 µL (280 µL)	7	7
8	8	8 drops / 40 µL (320 µL)	8	8
9	9	9 drops / 45 µL (360 µL)	9	9
10	10	10 drops / 50 µL (400 µL)	10	10

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 14 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

Volumes for 6 mm slide wells

# of wells	White Cap	Yellow Cap	Red Cap	Green Cap
	Volume Fixation Solution	Volume Sample Prep* / Vol DTT	Volume Blocking	Volume Staining
1	20 µL	20 µL / 2.5 µL (~25 µL)	20 µL	20 µL
2	40 µL	40 µL / 5 µL (45 µL)	40 µL	40 µL
3	60 µL	60 µL / 15 µL (75 µL)	60 µL	60 µL
4	80 µL	80 µL / 17.5 µL (~100 µL)	80 µL	80 µL
5	100 µL	100 µL / 20 µL (120 µL)	100 µL	100 µL
6	120 µL	120 µL / 22.5 µL (~150 µL)	120 µL	120 µL
7	140 µL	140 µL / 25 µL (165 µL)	140 µL	140 µL
8	160 µL	160 µL / 27.5 µL (~190 µL)	160 µL	160 µL
9	180 µL	180 µL / 30 µL (210 µL)	180 µL	180 µL
10	200 µL	200 µL / 32.5 µL (~235 µL)	200 µL	20 µL

*Sample prep solution requires indicated volume of DTT added to indicated number of drops. Final volume (in parenthesis); place 80 µL of solution on sample well.

Table 2: Solution Volumes for Smear Slides and SPERM HY-LITER™ and SPERM HY-LITER™ EXPRESS

# of Smear Slides	White Cap	Yellow Cap	Red Cap	Green Cap
	No. Drops Fixation	No. Drops Sample Prep* / Vol DTT	No. Drops Blocking	No. Drops Staining
1	8	8 drops / 40 µL (320 µL)	8	8
2	16	16 drops / 80 µL (640 µL)	16	16
3	24	24 drops / 120 µL (960 µL)	24	24
4	32	32 drops / 160 µL (1,280 µL)	32	32
5	40	40 drops / 200 µL (1,600 µL)	40	40
6	48	48 drops / 240 µL (1,920 µL)	48	48
7	56	56 drops / 280 µL (2,240 µL)	56	56
8	64	64 drops / 320 µL (2,560 µL)	64	64
9	72	72 drops / 360 µL (2,880 µL)	72	72
10	80	80 / 400 µL (3,200 µL)	80	80

*Sample prep solution requires indicated volume of DTT added to indicated number of drops. Final volume (in parenthesis); place 320 µL of solution on smear slide.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 15 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	

Anexo 3: Protocolo para rápida detección de espermatozoides en 5 fáciles pasos.





M-EXT-ECE-BIO-128
Manual de Usuario
Sistema de Microscopio
Sperm-Hy-Liter
Registro: 29/10/21
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

vay@ifi-test.com Raymundo David Piñones Pérez
Cel. +1-312-887-2002

SPERM HY-LITER™

Manual de Usuario del Sistema de Microscopio



Microscope System User Manual SPANISH

v 4

pg. 1 of 14

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	





500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

SPERM HY-LITER™ Diagrama del Paquete de Microscopio



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 17 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41



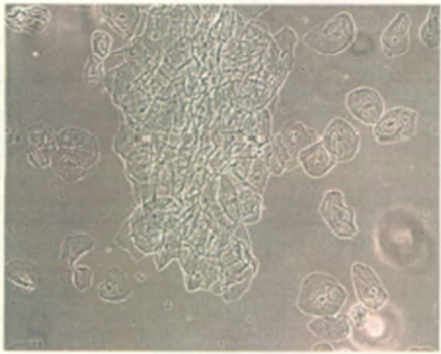


500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

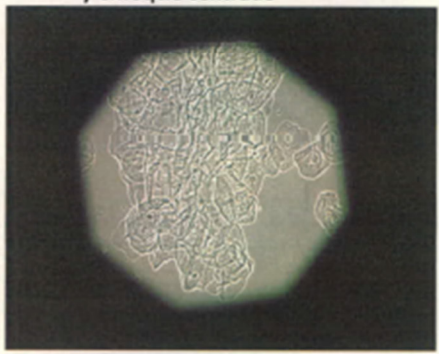
Configuración del microscopio para contraste de fases

1. Encienda el microscopio con el interruptor de encendido en el lado izquierdo del soporte.
2. Asegúrese de que hay luz procedente de la parte inferior del soporte. Ajuste el control de filtración de luz transmitida girándolo a la posición "1". Ajuste la intensidad de la luz girando el control intensidad de la luz transmitida para aumentar o disminuir la luz.
3. Gire la torreta de fases del condensador a la posición "2". Asegúrese de que el diafragma de apertura está abierto completamente colocando la palanca del diafragma hacia la izquierda.
4. Coloque el objetivo 20X en el haz de la luz.
5. Gire completamente la torreta de fluorescencia a la posición "1" o posición en blanco.
6. Empuje divisor de haz de luz / cámara, para ver a través de los oculares (jale para ver a través de la cámara).
7. Coloque el portaobjetos en el soporte de portaobjetos en la platina. Mueva la platina girando la perilla de enfoque gruesa hacia adelante, de esta manera la parte superior del cubreobjetos se aproxima a la lente de objetivo 20X pero no se tocan.
8. Ajuste la distancia interpupilar de los oculares para una mejor visualización. También ajuste el ángulo del ocular de acuerdo con la estatura del usuario para una mejor y más cómoda visualización.
9. Ajuste la dioptría de enfoque en ambos oculares. Gire la parte superior del ocular para que la posición "0" coincida con "punto" blanco si tiene visión 20/20 o corregida. Si utiliza el retículo del micrómetro horizontal, gire dioptría al punto rojo.
10. Logre enfocar la muestra moviendo la platina lentamente hacia abajo, ajustando el tornillo micrométrico (gire el tornillo hacia usted).
11. Cierre el diafragma de campo y centre la imagen usando los tornillos de centrado del condensador.
12. Enfoque la imagen del diafragma de campo (octógono) elevando la altura del condensador hasta que la imagen esté enfocada (como muestra a continuación).
13. Abra el diafragma de campo al borde del campo de visión.

Muestra enfocada a 20X



Muestra enfocada con condensador y enfoque centrado



Microscope System User Manual SPANISH

v 4

pg. 3 of 14

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 18 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	



500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

Alineación de microscopio para campo claro

1. Encienda el microscopio usando el interruptor de encendido en el lado izquierdo del soporte del microscopio.
2. Asegúrese que hay luz procedente de la parte inferior del soporte. Gire la rueda filtrante de luz transmitida a la posición "1". Ajuste la intensidad de la luz girando el control de intensidad de la luz transmitida para aumentar o disminuir la luz.
3. Gire la torreta de fases del condensador a la posición "BF". Asegúrese que el diafragma de apertura este casi cerrado en su totalidad (para ofrecer contraste) pero deje pasar un poco de luz.
4. Coloque el objetivo 20X en el haz de la luz.
5. Gire completamente la torreta de fluorescencia a la posición "1" o posición en blanco.
6. Empuje el divisor de haz de luz / cámara, para ver a través de los oculares (jale para ver a través de la cámara).
7. Coloque el portaobjetos en el soporte de portaobjetos en la platina. Mueva la platina girando la perilla de enfoque gruesa hacia adelante, de esta manera la parte superior del cubreobjetos se aproxima a la lente de objetivo 20X pero no se tocan.
8. Ajuste la distancia interpupilar de los oculares para una mejor visualización. También ajuste el ángulo del ocular de acuerdo con la estatura del usuario para una mejor y más cómoda visualización.
9. Ajuste la dioptría de enfoque en ambos oculares. Gire la parte superior del ocular para que la posición "0" coincida con "punto" blanco si tiene visión 20/20 o corregida. Si utiliza el retículo del micrómetro horizontal, gire dioptría al punto rojo.
10. Logre enfocar la muestra moviendo la platina lentamente hacia abajo, ajustando el tornillo micrométrico.
11. Cierre el diafragma de campo y centre la imagen usando los tornillos de centrado del condensador (como se indica a continuación).
12. Enfoque la imagen del diafragma de campo (octógono) elevando la altura del condensador hasta que la imagen esté enfocada (como muestra a continuación).
13. Abra el diafragma de campo al borde del campo de visión.

Imagen de células enfocadas usando la iluminación de campo claro



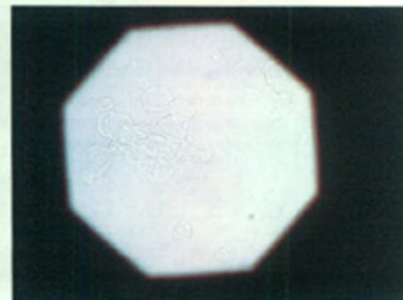
Microscope System User Manual SPANISH

Centrando el condensador



v 4

Enfocando el condensador



pg. 4 of 14

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 19 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™	P-DCF-ECT-BIO-41	



500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

Protocolo de Microscopio para Fluorescencia de Montaje Directo



La nueva fuente de luz de haluro metálico de 75W de montaje directo es simple de operar, tiene una pequeña fuente de alimentación que ahorra espacio y tiene una bombilla que durará 1500 horas.

1. Para encender la fuente de luz, cambie el interruptor de "STANDBY" a "RUN". El LED tardará sólo un minuto para calentarse y estar listo para usar. Pasará por una serie de pasos cuando lo encienda por primera vez. Primero parpadeará y el LED mostrará "STRIKE LT", luego "WARMING UP" donde se mostrarán las horas de bombilla utilizadas y finalmente, el parpadeo se detiene y el LED lee "LAMP ON" y el número de horas de bombilla utilizadas.




2. Una vez encendida la luz de la carcasa de la lámpara, es importante dejarla encendida durante 5 minutos antes de volver a apagarla. Esto permite que la bombilla alcance la longitud de onda adecuada y ahorrará la vida útil de la bombilla (que está garantizada durante 1500 horas).
3. Para apagar la fuente de luz, cambie el interruptor a "STANDBY". El LED indicará "LAMP OFF - CoolDown". Espere hasta que haya terminado de enfriar (5-10 minutos) antes de volver a encenderlo. Esto también ahorrará en la vida de la bombilla. La unidad sí mismo tiene algunos protectores seguros contruidos adentro también, que guardarán contra girar el bulbo encendido o apagado antes de que esté listo.




4. No coloque nada encima de la fuente de luz y permita una ventilación adecuada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 20 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41




Independent Forensics
DNA TESTING & TECHNOLOGIES




500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

Instrucciones para Observaciones con Fluorescencia

- Coloque el objetivo 20X en el haz de la luz y gire el condensador a la posición 2.
- Enfoque la muestra utilizando el contraste de fase.
- Cubra la fuente de luz inferior con tapa protectora de polvo o gire la rueda del filtro de luz transmitida a la posición cerrada (círculo blanco) para asegurar un fondo oscuro.
- Gire la torreta de fluorescencia de la posición 1 a la posición 2 o FITC.



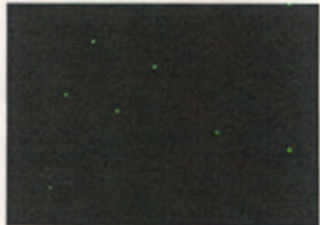
Vista de frente del microscopio mostrando la torreta fluorescente, en posición 2



Controles de diafragma de campo y diafragma de apertura girados hacia arriba y el obturador (deslizador) en posición abierta (no disponible en Axioscope A5).

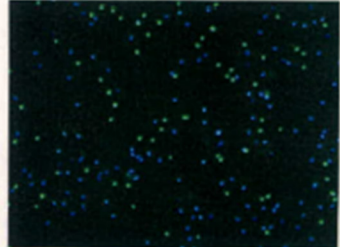
- Deslice el obturador de luz reflejada hacia fuera a la posición 1 (posición abierta) y gire las ruedas del diafragma de campo y del diafragma de apertura (si están disponibles) para obtener la máxima cantidad de luz a la muestra. Ver ejemplar. Enfoque según se a necesario. Las cabezas de los espermatozoides aparecerán de color verde brillante sobre un fondo oscuro.

cabezas de espermatozoides teñidos con SPERM HY-LITER™ visualizados bajo iluminación fluorescente y filtro FITC con objetivo 20X



- Gire la torreta de fluorescencia a la posición 3 o DUAL. Las cabezas de los espermatozoides aparecerán de color verde brillante, mientras que los núcleos de las células epiteliales y todos los demás núcleos celulares aparecerán azules.

Tinción de espermatozoides y núcleos celulares con SPERM HY-LITER™ vistos con iluminación fluorescente y filtro DUAL con objetivo 20X



Microscope System User Manual SPANISH

v 4

pg. 7 of 14

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 21 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41



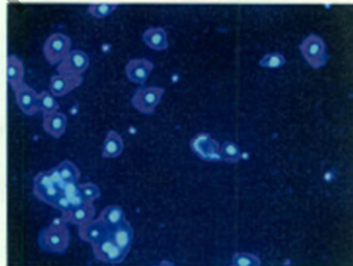
500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

7. Gire la torreta de fluorescencia de fluorescencia a la posición **4 o DAPI** para ver sólo los núcleos. Tenga en cuenta: Las observaciones de fluorescencia bajo iluminación DAPI deben ser rápidas ya que existe el **PELIGRO DE FOTOBLANQUEO Y FOTOACTIVACION**. Una vez que se ha completado la observación, cierre / empuje inmediatamente el obturador de fluorescencia.

Tinción de espermatozoides con SPERM HY-LITER™ visto bajo iluminación fluorescente y filtro DAPI con objetivo 20X, ligeramente subexpuestas



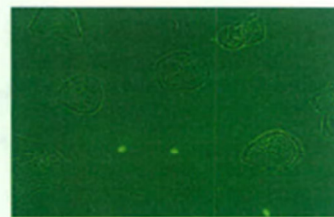
Tinción de espermatozoides con SPERM HY-LITER™ vistos bajo iluminación fluorescente y filtro DAPI con objetivo 20X, imagen sobreexpuesta



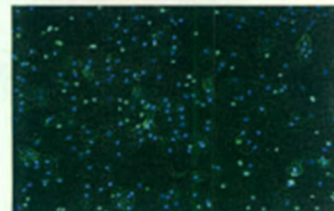
Visualización de contraste de fase y fluorescencia juntos

1. Mientras observa una muestra usando cualquiera de los filtros de fluorescencia, retire la cubierta de polvo inferior o gire la rueda del filtro de luz transmitida a la posición abierta.
2. Ajuste la intensidad de la luz transmitida a una configuración más baja de tal manera que tanto la fluorescencia como la iluminación de contraste de fase puedan verse simultáneamente. Esto es ideal cuando desea verse la estructura celular y la tinción fluorescente juntos.

La combinación de contraste de fase y FITC es útil para ver las brillantes cabezas de espermatozoides y la morfología de las células.



Combinando el contraste de fase y la iluminación fluorescente DUAL se confirmarán las células epiteliales, los espermatozoides y los núcleos teñidos con SPERM HY-LITER™.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 22 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41



500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

PROTOCOLO PARA RÁPIDA DETECCIÓN DE ESPERMA EN CINCO FÁCILES PASOS

1. Encienda el instrumento.

Encienda las fuentes de luz transmitida y reflejada: el microscopio se enciende y la lámpara de fluorescencia se enciende.

2. Encuentre el plano focal correcto.

Gire la torreta de fluorescencia a la posición 1 (posición vacía). Coloque el objetivo 20X, verifique que la posición 2 está ajustada en el condensador, enfoque el área enmascarada del portaobjetos (porción negra del portaobjetos) para identificar aproximadamente el plano focal y busque las células.

3. Observe la muestra bajo fluorescencia.

Obtore la luz transmitida girando la rueda del filtro hasta la posición de parado (punto blanco). Deslice el obturador a la posición abierta. Gire la torreta de fluorescencia a la posición 2 (FITC). Escanee el portaobjetos para ver si hay cabezas de esperma fluorescentes.

4. Confirme la identificación.

Utilizando los filtros DUAL (posición 3), el DAPI (posición 4) y el contraste de fase en combinación con la fluorescencia, confirme la identidad de los cabezas de esperma teñidas con SPERM HY-LITER™. Las cabezas de los espermatozoides deben tener una fluorescencia verde con el FITC (esperma positivo) y azul con el DAPI (nuclear positivo).

5. Registre la observación.

Usando la cámara CCD y el software de captura de imágenes, registre los campos del microscopio que mejor ilustran la identificación del esperma. Vea más detalles en la siguiente página.


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 23 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41



500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

FÁCIL CAPTURA DE IMAGEN




1. Asegúrese de que el divisor de haz del microscopio esté en la posición (halar el divisor hacia afuera) donde los oculares no estén disponibles al mismo tiempo, de esta manera la cámara ahora recibe el 100% de la luz.
2. Encienda la PC y abra el software **INFINITY CAPTURE**  haciendo clic en el icono del escritorio.
3. La cámara se conectará una vez que se enciende la luz verde en la parte posterior. Si la luz no se enciende una vez que se abre el software, cierre la ventana de control de la cámara y verifique que todos los cables estén conectados firmemente. Si es necesario, cambie a un nuevo puerto USB2 en la PC / computadora portátil y reinicie el software.
4. Una vez que la cámara está conectada correctamente y el software se inicia, presentará automáticamente una imagen en vivo y una ventana de control de la cámara "Camera Control Window" (como se muestra a continuación). Si no ve la Vista previa en vivo, vaya al menú "Window" y desplácese hasta "Restore Live Preview".
5. Desde la ventana de Control de la Cámara, puede ajustar la exposición, el balance de blancos, la configuración de color y capturar imágenes. Para ajustar la configuración, haga clic en los iconos como se muestra a continuación o use el menú desplegable de la Cámara.

The screenshot shows the INFINITY CAPTURE software window with the following callouts:

- Captura de imagen:** Points to the camera capture icon in the toolbar.
- Balance de blancos global (uso en fase):** Points to the white balance target icon.
- Balance de blancos puntual (Usar con tinciones de color con luz transmitida):** Points to the manual white balance icon.
- El ajuste de ganancia debe establecerse bajo para reducir el ruido.** Points to the Gain (x) slider.
- Balance de blancos manual para ajustar los colores:** Points to the manual white balance icon.
- Control de exposición automático:** Points to the AEC (Auto Exposure Control) checkbox.
- Barra deslizante para exposición manual (arriba para vista previa, abajo para captura):** Points to the manual exposure slider.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 24 de 24
PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN DEL SPERM HY-LITER™		P-DCF-ECT-BIO-41



500 WATERS EDGE
SUITE 210
LOMBARD, IL 60148
TEL (866) 434-2400
FAX (708) 978-5115
WWW.IFI-TEST.COM

6. Ajuste el balance de blancos en contraste de fase seleccionando **Balance de Blancos Global** o use **Balance de blancos puntual** colocando el objetivo (+) en el área incolora (blanco / gris) en la pantalla de vista previa en vivo. Mantenga presionado (+) sobre el punto y haga clic para equilibrar el blanco.

7. Los colores se pueden ajustar fácilmente seleccionando el **Balance de Blancos Manual** en forma de "V" y ajustando el **Rojo**, el **Verde** y el **Azul** por separado, luego cierre para mantener la configuración o inicialice los colores para volver a la configuración anterior.

8. Hay una casilla frente a **AEC** que al marcar **configura de manera automática una exposición estimada a la normal**. Esto puede ser útil para buscar una imagen inicialmente cuando la pantalla es demasiado brillante u oscura. Una vez que la casilla **AEC** está marcada, anula cualquier configuración manual hasta que la desmarque. Nota: la configuración automática de la cámara suele ser más lenta que la configuración manual.

9. La **exposición manual** se puede ajustar moviendo la barra deslizante superior hacia la izquierda o hacia la derecha. Las barras deslizantes de exposición la vista de captura y vista previa se moverán juntas a menos que la casilla "**Alt Exp**" está marcada. La **configuración manual** no está disponible si la casilla **AEC** está marcada al mismo tiempo.

10. Tome una **captura** de la imagen de **vista previa en vivo** haciendo clic en el icono de la cámara o seleccionando "**Capture Image**" en el menú "**File**". La imagen capturada aparecerá en el escritorio como "**Image Preview**".

11. **Guarde la imagen** haciendo clic en "**File**" y "**Save As**" y cree una carpeta para las imágenes. No cierre la imagen antes de guardarla en un archivo. Hay una opción para habilitar el **guardado automático** en el menú desplegable "**Options**".

12. **Guarde imágenes** de diferentes casos en las ubicaciones que usted prefiera. Las imágenes se pueden guardar como mapa de bits, JPEG, Tiff o Raw. Los archivos de mapa de bits se guardan fácilmente y tienen un tamaño de 3-5 MB por imagen.

13. Las **configuraciones de la cámara** se quedan guardadas en C: \ Archivos de programa (x86) \ Lumenera \ Infinity Software \ Infinity Camera Settings

¿Preguntas? ¿Necesitas ayuda? Teléfono: 1-708-234-1200 or toll-free in the US 866-434-2400
Correo electrónico: info@ifi-test.com
Móvil: 1-630-697-0020
Skype: Dina.Mattes1