Elaborado o modificado por:	**Revisado por Líder Técnico**
Dra. Karla Chacón Méndez **Perito Judicial 2B, Sección de Biología Forense**	**Dra. Karla Chacón Méndez** **Perito Judicial 2B, 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** **Jefe, Sección de Biología Forense**

COPIA NO CONTROLADA

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
Modificaciones debidas a la Auditoría Interna.	13-26	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

Establecer el procedimiento para la realización de una tinción específica que permita la detección de espermatozoides y/o cabezas de espermatozoides en diferentes muestras recolectadas de indicios trabajados en la UCII en casos forenses.

2. Alcance

Este PON se emplea como parte de la investigación de semen utilizando la tinción de Christmas Tree para verificar o descartar por observación microscópica la presencia de cabezas de espermatozoides y/o espermatozoides completos en todos los extractos realizados a partir de muestras recolectadas de diferentes indicios que se trabajan en la UCII. Además el mismo 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-2019, 006-BIO-VAL-2021 y 004-BIO-VAL-2022

3. Referencias

- Coastal Healthcare. 1992. Bloodborne Pathogens. Virginia Beach, VA.USA.

- Forensic Science Research and Training Center, Laboratory Division, FBI Academy. Quantico, Virginia, USA Proceedings of a Forensic Science Symposium on the Analysis of
  Sexual Assault Evidence The Laboratory Division. 1983.

- Gaensslen, R.E. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry. National Institute of Justice. 1983.

- Poy, A.; van Oorschot, R. A. H. Beware; gloves and equipment used during the examination of exhibits are potencial vectors for transfer of DNA-containing material.
  International Congress Series No.1288 (2006) 556-558.

- Solano Naranjo, P. Informe de validación la Investigación por semen: por medio de Tinción Christmas Tree (Identificación de espermatozoides), 005-BIO-VAL-2019. 2019. Sección de Biología Forense. Departamento de Ciencias Forenses. San José, Costa Rica.

- Solano Naranjo, P. Adendum a la validación la Investigación por semen: por medio de Tinción Christmas Tree (Identificación de espermatozoides), 006-BIO-VAL-2021. 2021. Sección de Biología Forense. Departamento de Ciencias Forenses. San José, Costa Rica.

- Solano Naranjo, P. Adendum a la validación la Investigación por semen: por medio de Tinción Christmas Tree (Identificación de espermatozoides), 004-BIO-VAL-2022. 2022. Sección de Biología Forense. Departamento de Ciencias Forenses. San José, Costa Rica.

COPIA NO CONTROLADA

4. Equipo y Materiales

- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, no punzo cortante.
- Botellas de vidrio color ámbar para almacenar los colorantes limpias* con detergente Terg- A- zyme al 1% (ver anexo 1)
- Cámara fotográfica digital, marca Canon EOSRebel T4i, o similar.
- Computadora con acceso a red y al Sistema de Automatización del Departamento de Ciencias Forenses (SADCF).
- Calentador de porta objetos marca Fisher ™ o similar.
- Centrífuga marca "Thermo scientific" o similar, con capacidad para alcanzar 13000 rpm.
- Cronómetro o reloj de intervalos que marque minutos y segundos. (rango 0 a 60 minutos)
- DNA IQ Spin basket Promega referencia V1221 o similar. (canasta para tubos de 1,5 mL)
- Cubre cabezas
- Formulario "FORMULARIO DE REVISIÓN Y/O TRASLADO DE EXTRACTOS CONFIRMATORIOS" (P-DCF-ECT-BIO-37-R13).
- Formulario para Reactivos preparados (M-DCF-GCG-JEF-01-R2) (Disponible en el Gestor Documental).
- Gabacha desechable limpia o de tela que se encuentre limpia.
- Gradilla para tubos de micro centrifuga limpias. ***
- Guantes desechables de nitrilo o similar.
- Lapicero.
- Lápiz de cera.
- Lápiz de grafito.
- Libros de control de uso de la centrifuga, microscopio, vórtex y thermomixer.
- Mascarilla desechable.
- Marcador de tinta indeleble.
- Micropipeta graduable de 0,5 µL a 10 µL o similar. Limpie la parte externa de las micropipetascon DNA Away y luego con etanol al 70%. finalmente con agua desionizada utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Micropipeta graduable de 100 µL a 1000 µL, o con capacidad de medir y dispensar 750 uL. Limpie la parte externa de las micropipetas con DNA Away y luego con etanol al 70%. finalmente con agua desionizada utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes".
- Microscopio de luz binocular con lente de inmersión, marca Zeizz ™ o similar. (aumento 100X)
- Papel filtro 1PS.

COPIA NO CONTROLADA

- Papel Parafilm.
- Papel toalla desechable, o toallas de taller "Kimtech Prep* brand", de Kimberly-Clark, o similares.
- Pinzas de metal limpias. Lave la punta de la pinza entre muestras, con etanol al 70 y/o DNA Away, siempre utilice toallas suaves desechables "Kimwipes" o similar. También pueden ser pinzas autoclavadas, si cuenta con una pinza por muestra, no es necesario hacer las limpiezas entre muestras.
- Pipetas tipo pasteur plásticas desechables de 5 mL u otro similar.
- Pizetas limpias para etanol absoluto y metanol.
- Porta-objetos nuevos con cantos esmerilados de 25 X 75 mm o similares.
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta de 0,5-10 µL.
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta de 100-1000 µL.
- Recipientes de material plástico rígido para "punzo cortantes" preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra acompañada del símbolo de biopeligrosidad.
- Refrigerador con temperaturas cercanas a los 4° C. (rango 2-8°C +/- 2°C)
- Rejilla de metal limpia ** para laminas o similar para realizar la tinción.
- Thermo Mixer marca Eppendorf 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.
- Toallas desechables tipo "Kimwipes".
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL nuevos y autoclavados.
- Vórtex marca "Fisher Scientific Touch Mixer" Modelo 231 o similar.

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 desionizada tipo Milli-Q o similar. Deje escurrir sobre papel absorbente y al encontrarse seco, prepare el material para el proceso de autoclavado.
** Para su lavado, solamente enjuague con agua de tubo y deje secar a temperatura ambiente.

***Para su limpieza, limpie con Kimwipes y DNA away y posterior con un kimwipe y alcohol para eliminar el exceso.

5. Reactivos y Materiales de Referencia

- Aceite de inmersión para utilizar con lente de inmersión 100X en microscopio de luz.
- Agua destilada una vez y autoclavada.
- Agua de tubo.

- Control de semen en diluciones: 1/50 almacenados en refrigeración.
- Control negativo para la tinción: Buffer de corrida para análisis de p30 que viene con el Kit.
- DNA Away (N.º Catalogo 7010), solución descontaminante de ADN y ARN asas, , o similar.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70 % grado comercial.
- Jabón neutro para lavado de cristalería, marca Alconox o similar.
- Picroindigocarmin.
- Rojo Nuclear o Solución de Kernecntol.

COPIA NO CONTROLADA

6. Condiciones Ambientales

Condiciones de trabajo no son críticas para el análisis. La temperatura no es un factor crítico.

7. Procedimiento

7.1 Preparación de los extractos para la investigación por espermatozoides.

7.1.1 Antes de empezar el análisis, colóquese guantes, gabacha desechable, mascarilla desechable y cubrecabezas.

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 01: Las muestras pueden ser los mismos extractos que fueron utilizados para el análisis de p30, por lo que vienen a partir proceso de extracción en el thermomixer donde se continua con el tiempo de incubación o pueden estar en refrigeración, si solo requieren de este análisis.

Nota 02: Si a estas muestras no es requerido realizarle el análisis de p30, debe 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 la revisión realizada previamente.

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 03: 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.

Nota 04: Revise los controles y sus fechas antes de utilizarlos, en caso de que no se tenga controles o que estén vencidos, informarle al encargado de la preparación de los controles para su respectiva preparación.

Nota 05: Los reactivos deben de utilizarse antes de la fecha de vencimiento, sin embargo, se pueden utilizar materiales luego de su fecha de expiración, a modo de excepción, siempre y cuando, se les realicen tanto los controles positivos como negativos y estos tengan los resultados aceptables. Si los resultados obtenidos en el análisis de los controles no son adecuados, no debe utilizar estos reactivos y proceder a utilizar un reactivo sin vencer.

Nota 06: El montaje de estos controles por fecha de vencimiento, y sus resultados deben de archivarse en la misma carpeta que se archivan los controles de los reactivos preparados para su verificación, solo que con el título de "Verificación de reactivo lote XXXXX, por fecha de vencimiento"

Nota 07: Se debe asegurar que se agregó la información de los reactivos utilizados para la tinción de Christmas Tree, la cual seria: Tipo de reactivo o material: "Reactivo preparado", Descripción: "Nombre de reactivo, lote de preparación", fecha de apertura o preparación: "corresponde a la fecha de preparación del reactivo que se esta utilizando" y la persona responsable de dicha preparación. Esta información se coloca en la pestaña de "Reactivos y materiales" del Proceso de "Registro de análisis en serie". Este paso no es crítico dentro del proceso por lo que se puede realizar durante alguno de los momentos de registro de datos en el Proceso RAS.

COPIA NO CONTROLADA

7.1.5 Proceder con el montaje de los análisis a las muestras y los controles que se han autorizado para ese fin después de realizar la revisión previa a registrar en el RAS o si viene directamente después del análisis de p30.

Nota 08: A los controles se les debe realizar el procedimiento tal cual como si fuese una muestra. Ya sea que provenga del procedimiento de análisis por p30 o inicie su montaje según el punto 7.1.6.

7.1.6 Agregue a cada tubo tubo eppendorf de 1,5 mL que ya tienen el recorte de la muestra o el control 750 uL de buffer de extracción que viene con el Kit para la determinación de P30. Si los extractos provienen del análisis por p30 estos ya tienen el buffer de extracción.

7.1.7 Coloque como analista encargado del montaje de los análisis, los tubos en el thermomixer a una velocidad de agitación de 400 rpm aproximadamente por un tiempo de 12 horas aproximadamente y a una temperatura entre 2-8 grados centígrados. Si las muestras ya vienen del análisis de p30, ya tienen 2 horas de incubación, por lo que nada más continúe con el tiempo que resta para completar las 12 horas de incubación.

7.1.8 Una vez terminado el tiempo de agitación centrifugue por un tiempo de 5 minutos aproximadamente, a una velocidad de 13000 rpm aproximadamente utilizando la centrifuga, para asegurarse que todos los espermatozoides que puedan quedar suspendidos en el buffer se vayan al fondo.

7.1.9 Tome un spinbasket para tubos de 1,5 mL y coloque con pinzas limpias (el procedimiento de limpieza se indica en el presente PON en el punto 4) los trozos de tela o soporte del que se tiene el extracto. Coloque el spinbasket en el tubo de microcentrífuga que tenia la muestra originalmente.

7.1.10 Haga lo mismo con cada una de las muestras y controles que tenga para montar la tinción de CT, esto limpiando la punta de la pinza entre muestras, utilizando DNA Away y/o etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes" o similar o utilizando una pinza individual por cada muestra.

7.1.11 Centrifugue por 6-8 minutos aproximadamente, a 13.000 rpm los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL conteniendo en su interior el spin basket.

7.1.12 Descarte el spin basket.

7.1.13 Preserve el tubo Eppendorf con el botón de centrifugado y buffer.

COPIA NO CONTROLADA

7.2 Elaboración y tinción de los portaobjetos para la investigación de espermatozoides.

7.2.1. Tome un porta objetos y dibuje de uno a tres círculos de 3mm de diámetro (aproximadamente) con un lápiz de cera. Asegurándose que haya un círculo por extracto a montar así como para el control positivo y control negativo.

Nota 09: La cantidad de muestras depositadas por portaobjetos pueden ser hasta 3 (una por círculo), siempre y cuando todas pertenezcan al mismo caso. Si el caso solamente tiene una muestra dejar solo un circulo en el portaobjetos.

Nota 10: Las muestras de control positivo y control negativo deben de montarse en un porta objetos por aparte, no en alguno que tenga muestras.

7.2.2. Rotule el portaobjeto, en la parte biselada, con el numero de BIO y número de identificación de la muestra, para cada uno de los extractos a analizar, de manera tal que sea clara la identificación y ubicación en el portaobjetos de cada una de las muestras.

Nota 11: Esta rotulación puede ser de manera manual con un lápiz de grafito o con el sticker generado en la impresora BarTender, siempre y cuando contenga la información mencionada.

7.2.3. Tome 3 µL del botón de células que se encuentra en el fondo del extracto centrifugado, con mucho cuidado y coloque la muestra en el portaobjeto, dentro del circulo correspondiente.

7.2.4. Repita el punto anterior para cada uno de los extractos a analizar.

7.2.5. Deposite 3uL del control negativo y 3uL del control positivo de semen en las áreas destinadas para cada uno de ellos.

7.2.6. Deje secar los portaobjetos con las muestras depositadas en ellos, esto se puede hacer en el calentador de portaobjetos por una hora o hasta que se vean secas a una temperatura cercana a los 37°C aproximadamente.

7.2.7. Fije cada una de las muestras depositadas en los círculos del portaobjetos con la cantidad necesaria de metanol para cubrir dichas muestras.

7.2.8. Deje secar los portaobjetos al aire.

7.2.9. Coloque los portaobjetos, incluyendo el que contiene a los controles, en la bandeja de tinción o rejilla para laminas.

7.2.10. Agregue colorante rojo nuclear sobre cada portaobjetos cubriendo la muestra y déjelas reposar por 15 minutos aproximadamente.

7.2.11. Elimine todo el colorante del portaobjetos una vez terminado el tiempo indicado, para esto utilice una pizeta con agua desionizada tipo Milli- Q o similar, lavando con suavidad con cuidado de no arrancar la muestra de la lámina.

7.2.12. Deje escurrir ligeramente.

7.2.13. Agregue el colorante Verde Picroindigocarmin sobre cada uno de los portaobjetos cubriendo la parte donde se depositó la muestra. Déjelo reposar por unos 20- 30 segundos aproximadamente.

7.2.14. Lave cada uno de los portaobjetos con una pizeta que contenga etanol absoluto, dejándolo caer, suavemente, por la parte de arriba de la laminilla, al cumplirse el lapso de tiempo.

7.2.15. Deje secar, una vez lavados. Inmediatamente, después de este punto, sólo es necesario el uso de gabacha.

COPIA NO CONTROLADA

7.3 Observación microscópica de los portaobjetos teñidos.

7.3.1. Utilizando un microscopio Zeiss Axio 10 o similar para la observación de las láminas. Revise que el microscopio este en la posición de reposo, anótese en el libro de control "Bitácora de Control de equipo en uso" que corresponde al microscopio.

7.3.2. Revise el portaobjetos que tiene los controles tanto positivo como negativo, con el lente de inmersión (100X), esto con el fin de revisar y asegurarse que la tinción se realizó de acuerdo al procedimiento y esta es adecuada para la revisión de las distintas muestras. Ver punto número 8 del presente Procedimiento.

7.3.3. Tome una fotografía de cada uno de los controles, tanto positivo como negativo. Pare evitar la posible confusión de las fotos de los controles con los de las muestras, pueden realizar varios procedimientos entre ellos tomar fotografías de un campo oscuro entre muestras o rotular las fotografías de manera inmediata con algo que identifique cual es el control positivo y cual el control negativo.

7.3.4. Proceder a observar cada una de las muestras incógnitas, cambiando los lentes objetivos, empezando con el objetivo desde donde como analista pueda observar de una manera más general la lámina, hasta llegar al de inmersión, esto lo hará el analista, según su preferencia para poder ubicarse en la lámina, asegurándose de revisar el campo completo.

7.3.5. Al llegar al de 100X, coloque en el portaobjetos a analizar una gota de aceite de inmersión en el círculo donde esta depositada la muestra y observe la muestra.

7.3.6. Reporte el resultado del análisis observado en el SADCF ya sea en el proceso de datos y resultados generado para cada caso o bien en un proceso RAS del SADCF, según corresponda y por muestra de la siguiente manera:

- POSITIVO: Si se observan cabezas típicas de espermatozoides. Con solamente una observada, se debe reportar como Positivo.
- NEGATIVO: Si no se observa ni una sola cabeza de espermatozoide en toda la lámina observada.

7.3.7. Tome tres fotografías de tres campos distintos de la muestra, si la misma esta negativa, una vez revisada una muestra en el microscopio. Si esta está positiva, tome una foto de alguno de los campos donde se observen las cabezas que corresponden a la muestra.

7.3.8. Proceda de esa manera con cada una de las muestras a revisar. Pare evitar la posible confusión de las muestras revíselas de manera que se mantenga un orden ya sea ascendente o descendente, y para separar las fotografías de las muestras y evitar que se vayan a mezclar se pueden realizar varios procedimientos entre ellos tomar fotografías de un campo oscuro entre muestras o rotular las fotografías de manera inmediata con el numero de caso y objeto agregando la leyenda a, b ó c según sea el caso. Otra manera de hacer esto, es anotar el número de las imágenes o de las fotografías tomadas por caso y por muestra, y así como las de los controles, en el punto 3 del FORMULARIO DE REVISIÓN Y/O TRASLADO DE EXTRACTOS CONFIRMATORIOS.

COPIA NO CONTROLADA

7.3.9. Pase todas las fotografías a formato de PDF 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 tanto positivo como negativo, las de los controles pueden ir en en un mismo PDF juntas.

7.3.10. Se debe realizar la rotulación de cada cuadro o imagen de cada uno de los archivos PDF anteriormente descritos, este procedimiento se realizará adjuntando un cuadro de texto en cada una de las imágenes con la siguiente información:

- Número de identificación OT (**202x-00000-BIO**).
- Id de Muestra (**89000xxxx-202x**) (**A ML01**)
- "Campo #" (p. ej. Campo 1; Campo 2, etc; según sea el caso) (Si solamente es un campo porque la muestra esta positiva , se coloca la leyenda "Campo 1 positivo"

- Por último **firme** el PDF con firma digital en el primer cuadro.

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

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

7.3.12. Una vez reportados los resultados (ya sea en un proceso RAS o el proceso datos y 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, seleccione "incorporar" y del desplegable que emerge complete de la siguiente manera:

- En tipo de documento: "Ilustraciones".
- En "Detalle del documento" coloque "Tinción CT",

Nota 12: En caso de que tenga que subir varias fotos del mismo tipo de análisis con fotos del mismo caso, entonces en detalle coloque "Tinción CT" y consecutivo para identificar cuantas fotos son. Por ejemplo: "Tinción CT-1"y en la siguiente foto "Tinción CT- 2", etc. Para los controles se debe colocar la leyenda "Tincion CT Controles".

- En "Ruta del documento" busque la dirección del documento adjuntar (carpeta intermedia donde las almacenó temporalmente) y guárdelo haciendo click sobre el disquete verde.

7.3.13. Si el peso de el 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.

7.3.14. Una vez terminada la observación microscópica de las láminas, limpie el microscopio de aceite y regréselo a su posición de reposo.

7.3.15. Anote en la bitácora de uso del microscopio al finalizar anotando la hora de finalización de uso del equipo.

7.3.16. Descarte las láminas negativas en el basurero de punzo cortantes y las positivas elimine el exceso de aceite y guárdelas en la caja destinada para esto.

7.3.17. Guarde los tubos eppendorf positivos en refrigeración por cada periodo de destrucción de indicios.

8. Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

Aceptación:

- El control positivo o control de tinción es aceptable, esto es si se observa la parte posterior de las cabezas típicas de los espermatozoides de un color rojo fuerte, el acrosoma o parte anterior queda sin teñir o toma un color rosado muy claro.

COPIA NO CONTROLADA

- Control Negativo aceptable: esto es que no se deben de observar cabezas o espermatozoides.

(Los resultados de los controles positivos y negativos se deben registrar en el formulario de Datos y resultados o proceso RAS del SADCF según corresponda.)

Rechazo: Si el control positivo o negativo no tienen el resultado esperado con lo descrito en los párrafos anteriores, proceda a montar de nuevo cada una de las muestras a partir del botón centrifugado de cada extracto y vuelva a teñir con otro grupo de colorantes.

9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre

N/A.

10. Reporte de Análisis y Resultados

Los resultados del análisis del Christmas Tree deben reportarse en un proceso de Datos y resultados generado en el SADCF para el número de OT respectivo, o bien si el montaje se hizo en lote en el proceso RAS generado para las muestras de los número de OT montados.

La interpretación de los resultados reportados, para concluir en el reporte en el Dictamen de Análisis Criminalístico es la siguiente:

Resultado observado	Interpretación	Conclusión en el dictamen.
0 cabezas/ 200 campos (NSO)	Negativo	• Si no hay nada más en el indicio:Escoja en el SADCF la opción que indique "Para cuando no hay nada" • Si el indicio tiene otros resultados positivos con otros análisis: No se concluye en el dictamen criminalístico con la conclusión de CT sino con la conclusión del fluido que haya dado positivo o de p30 si el p30 si dió positivo a pesar del resultado del CT.
1 o más cabezas de espermatozoides / 200 campos.	Positivo	Se selecciona en el SADCF la conclusión que corresponde al análisis, que sería: "Semen positiva CT"

11. Medidas de Seguridad

Recuerde colocarse la gabacha, la mascarilla y los guantes antes de manipular las muestras, para prevenir la contaminación de estas. De igual forma los fluidos biológicos impregnados en las muestras son fuente potencial de enfermedades por lo tanto debe manipularse según normas establecidas.

COPIA NO CONTROLADA

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

Debe tenerse en cuenta que las herramientas de trabajo (pinzas, etc) deben ser limpiadas adecuadamente, por cuanto pueden convertirse en sitios de transferencia de ADN entre muestras previamente trabajadas. Pinzas y tijeras representan un alto riesgo por cuanto entran directamente en contacto con la muestra que se examina.

Debe asegurarse de limpiar el área de trabajo antes y después de realizar las pruebas. Limpie la parte externa de las micropipetas con descontaminante de ADN y ARNnasas DNA Away Cat 7010 o similar y/o con etanol al 70% utilizando toallas suaves desechables "Kimwipes", una vez al mes.

Sea cuidadoso con la rotulación de los portaobjetos y verifique que el numero de rotulación de la misma concuerde con el numero de rotulación de la muestra. Cuando abra un tubo de micro centrifuga y dispense la muestra en el portaobjetos correspondiente, ciérrelo inmediatamente para evitar confusiones y contaminación.

Después de que utilizó la punta de micropipeta para colocar la muestra en el portaobjetos, deposítela en el recipiente para descarte de material punzocortante inmediatamente, para evitar su reutilización o posible accidente posterior.

Ante una eventual contaminación de la piel con la muestra analizada proceda a lavarse la zona afectada con abundante agua y jabón, posteriormente aplíquese alcohol al 70%.

Recuerde dejar la unidad de trabajo limpia y ordene los materiales para que pueda ser utilizada por otro analista, después de finalizar su tinción.

Deseche los portaobjetos o cualquier objeto frágil o punzo cortante en recipiente de paredes rígidas.

Cualquier, tubo de micro centrifuga contaminado con material biopeligroso debe ser descartado al finalizar en bolsa para el descarte de material bioinfeccioso, no punzocortante.

COPIA NO CONTROLADA

12. Simbología:

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BIO: Biología

CT: Christmas tree

°C: Grados Centígrados

N/A: No Aplica

NSO: No Se Observan

mm: Milimetro

mL: mililitro

OT: Orden de trabajo, número interno del caso asignado en la Sección de Biología.

PON: Procedimiento de Operación Normado

RAS: Reporte de análisis en serie.

RPM: Revoluciones por Minuto

UCII: Unidad centralizada de Inspección de indicios.

uL: microlitro.

13. Terminología:

Desechos punzo cortantes: 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. Estos son: todo tipo de agujas, hojas de bisturí, navajas, materiales rígidos como tubos de ensayo de vidrio y de plástico, puntas plásticas de micropipetas, todo tipo de jeringas, porta y cubre objetos, aplicadores, asas de microbiología, lancetas, placas de petri, pipetas pasteur, brocas, grapas, otros instrumentos metálicos con filo y punta, etc, que hayan estado en contacto con agentes infecciosos o sus fuentes.

14. Anexos

N.º de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 1

Detergente Terg-A-Zyme al 1%
Disuelva 10 gramos de detergente Terg – A- Zyme puro en un litro de agua de tubo. Prepare al momento del lavado del material, no se debe almacenar, debe ser consumido en su totalidad en el lavado.

Picroindigocarmin (para un volumen final de 200 mL)

- Pesar en una balanza analítica 2,67 g de ácido pícrico.
- Medir 200 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar en una probeta de 500 mL.
- Agregar el agua a un beaker de tamaño adecuado y adicionar el ácido pícrico al agua.
- Cubrir con papel parafilm y mezclar con una pastilla magnética, con mucho cuidado y en un agitador magnético hasta tener una mezcla saturada, dejando reposar toda la noche.
- Pesar 0,67 g de Indigocarmin en la balanza analítica.
- Agregarlo a la mezcla anterior.
- Ponerlo a agitar hasta que se disuelva.
- Filtrar usando papel de filtro 1PS.
- Guardar en botellas ámbar e identificadas con el nombre del reactivo, la fecha de elaboración, además de las condiciones de almacenamiento. (2-8°C)

Nota 13: Debido a que el ácido pícrico es una sustancia que es potencialmente explosiva, el mismo se almacena en la bodega externa al edificio. Debe trasladarse para su uso en el laboratorio en el envase de seguridad adecuado, evitando cualquier fricción, sacudida o choque del envase. De inmediato que haya sido utilizado, debe devolverse a la bodega con los mismos cuidados de transporte.

Rojo Nuclear o Solución de Kernecntol (para un volumen final de 200 mL)

- Pesar 10,0 g de sulfato d aluminio $Al_2 (SO_4)_3$ en la balanza analítica.
- Pesar 0,2 g del rojo nuclear (también llamado "Nuclear fast Red o Kernechtrot") en la balanza analítica.
- Medir en una probeta de 500 mL, 200 mL de agua desionizada Milli-Q o similar previamente calentada con un agitador magnético con calentador.
- Mezclar los anteriores en un beaker de tamaño adecuado y poner a agitar con una pastilla magnética hasta que se disuelva.
- Dejar enfriar.
- Filtrar usando papel de filtro 1PS.
- Guardar en botellas ámbar, identificadas con el nombre del reactivo, la fecha de elaboración además de las condiciones de almacenamiento (2- 8° C).

Etanol al 70%
Agregar 735mL de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y aforar con agua destilada tipo Milli-Q o similar estéril en 1 L balón aforado estéril.

COPIA NO CONTROLADA

Guardar en botella de vidrio estéril y almacenar a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

Nota 14: Una vez preparados dichos reactivos, se debe verificar su funcionamiento en la tinción antes de usarlos, esto para demostrar la calidad de la misma. De no pasar dicha verificación se deben preparar nuevamente.

Nota 15: Debe de tomar una foto de este control y dejar un registro de este. En caso de que el resultado de la tinción no sea el esperado, descarte la solución y vuelva a preparar otra.

COPIA NO CONTROLADA