Elaborado o modificado por:	**Revisado por Líder Técnico:**
Dr. Glen Arrieta Castro, **Profesional en Genética Forense,** **Sección de Genética Forense** **Raquel Ortiz Arguedas** **Técnico Especializado 6** **Sección 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 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	2012.09.14	2014.05.30	Versión Inicial del Procedimiento	-	MEE
02	2014.05.30	12/09/2016	Revisión y cambio de formato		EFM
03	12/09/2016	22/03/2017	Revisión y cambio de formato	16-2017	EFM
04	22/03/2017	15/06/2017	Lista de chequeo	27-2017	EFM
05	15/06/2017	18/07/2017	Revisión y edición	53-2017	EFM
06	18/07/2017	14/06/2018	Revisión y edición	64-2017	EFM
07	14/06/2018	13/05/2019	Revisión y edición	11-2018	EFM
08	13/05/2019	11/02/2021	Revisión y edición	06-2019	EFM
09	11/02/2021	22/06/2021	Revisión y edición	07-2021	EFM
10	22/06/2021	16/11/2023	Modificaciones posteriores a auditoria interna	21-2021	EFM
11	16/11/2023	24/04/2024	Revisión y corrección	25-2023	EFM
12	24/04/2024	25/02/2025	Revisión y edición	10-2024	EFM
13	25/02/2025		Cambio de nombre de la Sección. Revisión y edición.	08-2025	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:

El objetivo de este PON es proporcionar la metodología para realizar extracción Diferencial de ADN para separar las fracciones espermática y epitelial a partir de manchas de semen.

2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para extraer ADN a partir de hisopados vaginales, orales, anales y de otros sitios anatómicos, además de telas y otros soportes con manchas de semen de forma diferencial para obtener la fracción epitelial y la espermática utilizando técnica No Automatizada y/o Automatizada.

COPIA NO CONTROLADA

3 Referencias:

- 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. Chélex 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.
- QIAsymphony DNA Investigator Handbook. QIAGEN, 2013.
- QIAsymphony SP Protocol Sheet, QIAGEN, 2019.

4 Equipos y Materiales:

- Agitador magnético, Corning Stirrer/hot plate, IKA Mod C-MAG HS 10 o similar.
- Agitador tipo Vortex de 3 velocidades o similar.
- Aplicadores de madera con punta de algodón, nuevos y estériles.

- Autoclave capaz de generar 121 °C y 1,2 Kg 7 cm3 de presión o similar.
- Balanza analítica, marca Mettler Toledo Modelo AX-204, 200,0000 + 0,1 mg o similar .
- Balanza granataria marca Mettler Toledo PB-3002S, capacidad 3100,00 ± 0,01 g o similar.
- Balón aforado de 100 mL y 1 L, ó similar. *
- Baño de agua atemperado a 37 °C y 56 ºC (rango ± 1 ºC) o similar.
- Barra magnética plástica limpia y estéril. (*) (**)
- Beaker de 100, 200 y 1000 mL, ó similar. *
- Bolsa para descarte de material bioinfeccioso.
- Botella de vidrio pyrex transparente o similar, de 250 y 1000 mL con tapa. *
- Canasta para tubos de 1,5 mL (DNA IQ Spin basket Promega referencia V1221 o similar nuevas y autoclavadas).
- Congelador con temperatura cercana de -20º C (rango -18 a -23º C).
- Cubreboca desechable.
- Cubrecabeza desechable.
- Equipo automatizado para extracción de ADN tipo QIAsymphony o similar.
- Erlenmeyer de 100 mL, ó similar. *
- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Extracción Diferencial y No Diferencial de ADN a partir de manchas de semen: Sección de Genética Forense.
- Formulario: Reporte para Bitácora semen, Sección de Genética Forense.
- Formulario: Lista de verificación Procedimiento Extracción Diferencial con QIAsymphony: Sección de Genética Forense.
- Gabacha desechable o gabacha limpia.
- Gradilla.
- Guantes desechables.
- Micropipeteadores ajustables de 0,5-10µL, 2-20µL, 10-100µL, 10-200uL, 100-1000uL.**
- pHmetro calibrado, rango 0-14 + 0,1, Accumet o similar.

COPIA NO CONTROLADA

- Pinza de metal. *
- Pizeta con etanol al 70%.
- Puntas para micropipeta de 1-10 uL, 1-100 µL, 100-1000 µL, nuevas y estériles.
- Refrigerador con temperatura cercana a los 4 ºC (rango 2- 8 ºC $\pm$ 2 ºC).
- Termómetro (rango 0-100 °C o similar) con divisiones de 1 ºC, para baños de 37 ºC y 56 ºC.
- Thermomixer marca Eppendorff o similar.
- Tijeras de metal. *
- Toalla de papel desechable.
- Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL nuevos estériles con tapa.

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

* 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 similiar 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).

**Limpie la parte externa de las micropipetas con descontaminante de ADN y ARNnasas DNA Away Cat 7010, y/o con etanol al 70 % cada vez que la va a usar.

COPIA NO CONTROLADA

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua tipo Milli-Q o similar estéril. *
- Agua de tubo.
- Acido clorhídrico concentrado (HCl), grado reactivo, código H-7020 Marca Sigma o similar.
- Acido etilén diamino tetracético disódico (EDTA), grado biología molecular, Sigma E-5134 o similar, para preparar EDTA 0,5 M pH 8.
- Acido Etilendiamino tetracético (EDTA) 0,5 M pH 8. (Ver anexo número 01).
- Buffer de lavado. Ver Anexo número 01.
- Cloruro de Sodio (NaCl), grado biología molecular marca Merck 1540 o similar.

- Cloruro de sodio 5 M (Ver anexo número 01).
- Chelex, grado biología molecular Sigma C-7901 o similar.
- Chelex al 5% (Ver anexo número 01).
- Control positivo: Aplicadores impregnados con semen (ver Anexo 2.

Nota 2: este control NO es comercial y su duración dependerá de la cantidad preparada. Cada vez que se agote, se deberá extraer, cuantificar y tipear previamente a su análisis en rutina con el fin de poder garantizar su adecuado funcionamiento.

- Control de reactivos Negativo (ver Anexo 2).
- Descontaminante de ADN y ARNnasas, DNA Away Cat 7010 o similar.
- Detergente Terg-A-Zyme al 1% (Ver anexo número 01).
- Detergente Terg-A-Zyme grado comercial, marca Alconox.
- Dithiothreitol (DTT), grado biología molecular Sigma D-9799 o similar.
- DTT Dithiotreitol 1 M, acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 (Ver anexo número 01).
- Etanol al 70 % grado comercial.
- Kit de reactivos y consumibles para extracción de ADN por medio de equipo automatizado Qiasymphony o similar:
  - Cartuchos de reactivos.
  - Rack enzimas.
  - Tapas perforantes.
  - Buffer ATE.
  - Buffer ATL.
  - Carrier RNA.
  - Proteinasa K.
- Proteinasa K grado biología molecular marca Promega V3021 o similar.
- Proteinasa K (20 mg/mL).
- Sodio Dodecil Sulfato (SDS), grado biología molecular, Sigma L-4390 o similar.
- Tris–Base, Sigma T-8524, grado biología molecular o similar

COPIA NO CONTROLADA

- Tris-HCl pH 7,5 (1M) (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 BQM.

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 3: Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Extracción Diferencial de ADN NO Automatizada a partir de manchas de semen: Sección de Genética Forense y/o el Formulario: Lista de verificación Extracción Diferencial Automatizada utilizando el equipo QIAsymphony: Sección de Genética Forense como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

7.1 Utilice gabacha. guantes, cubreboca y cubrecabeza.

7.2 Limpiar el área de trabajo utilizando primero DNA-away o similar y posteriormente alcohol de 70%.

7.3 Seleccione las muestras a las que le va a realizar la extracción diferencial y/o la extracción No Diferencial de ADN o la extracción automatizada con QYAsymphony

Nota 4: La selección del método de extracción será, en primera instancia, método Automatizado y solamente en caso de faltante de reactivo, se utilizará el método de extracción Diferencia o extracción No diferencial No Automatizada

7.4 Extracción No Automatizada Diferencial para muestras:

- **Tinción de C.T.: presencia de leucocitos y espermatozoides**.

7.4.1 Al tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contiene el botón con células proveniente de las pruebas preliminares, agregue de 2-20 µL de proteínasa K 20 mg/mL y 50-100 µL de agua desionizada estéril tipo Milli-Q o similar.

Nota 5: Las cantidades de proteínasa K 20mg/ml y de agua estéril tipo Milli-Q o similar a adicionar dependerá de la cantidad de células epiteliales observadas y de la presencia y cantidad de leucocitos en la prueba preliminar de Tinción de C.T., de acuerdo a lo indicado en el reporte para Bitácora Semen, Sección de Genética Forense. Se recomienda usar de 10 a 20 ul de proteínasa K para las muestras en las que se reportó muchos o abundantes leucocitos en el C.T.

7.4.2 Agitar suavemente en vórtex.

7.4.3 Incubar a 37º C por al menos 60 minutos (para las muestras con leucocitos incubar por al menos 90 minutos). Si dicha incubación se realiza en el Thermomixer, la velocidad no debe de ser mayor a 500 rpm.

COPIA NO CONTROLADA

7.4.4 Rotular un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con al menos el número de OT y tipo de muestra y las iniciales "CE".

7.4.5 Agregar entre 30-50 µL de Chelex al 5% al tubo rotulado previamente como "CE".

7.4.6 Al finalizar la incubación, centrifugar los tubos por 10 minutos a un rango entre 12000 y 14000 r.p.m.

7.4.7 Agregar al tubo previamente rotulado como "CE" de 50-100 µL del sobrenadante obtenido en el punto 7.4.6. Esta corresponde a la fracción epitelial, guárdela para realizar el proceso de lisis posteriormente.

7.4.8 Agregar al botón 500 µL de buffer de lavado.

Nota 6: en muestras con recuentos de cabezas espermáticas entre 1-10 se debe valorar si es necesario realizar un lavado o si debe omitir este paso del procedimiento. No se recomienda más de un lavado cuando se observó baja cantidad de espermatozoides en el C.T. debido a la pérdida de material durante los mismos.

7.4.9 Agitar para resuspender el botón.

7.4.10 Centrifugar por 10 minutos a un rango entre 12000 y 14000 r.p.m.

7.4.11 Descartar el sobrenadante.

7.4.12 Repetir del paso 7.4.8 al 7.4.11 una o dos veces más máximo. La cantidad de lavados dependerá del número de espermatozoides, número de células epiteliales y presencia de leucocitos que se haya observado en la prueba de Tinción de C.T.

7.4.13 Agregar 500 µL agua tipo Milli-Q o similar estéril.

7.4.14 Agitar para resuspender el botón.

7.4.15 Centrifugar por 10 minutos a un rango entre 12000 y 14000 r.p.m.

7.4.16 Descartar el sobrenadante.

7.4.17 Agregar al botón entre 30 y 50 µL de Chelex al 5%.

7.4.18 Agregar 4-10 µL de proteínasa K 20 mg/mL. (ver **Nota 5**)

7.4.19 Agregar 7 µL de dithiothreitol (DTT) 1 M.

7.4.20 Agitar suavemente.

7.4.21 Colocar las muestras en el Thermomixer y seleccionar el programa de incubación "*Semen 2da incubación o similar*" (56º C/60min, 100º C/20min, 4º C/∞)

COPIA NO CONTROLADA

Nota 7: en caso de contar con el equipo Thermomixer proceder a incubar las muestras a 56º C por al menos 60 minutos, luego incubar las muestras junto a la fracción epitelial a temperatura de ebullición (aproximadamente 100ºC) por 20 minutos.

7.4.22 Centrifugar los tubos brevemente.

7.4.23 Guardar el extracto de 2 a 8 ºC ± 2 ºC.

7.4.24 Remitir las muestras para su respectiva cuantificación.

7.4.25 Las muestras que contienen DTT pueden presentar problemas en el proceso de cuantificación.

7.5 <u>Extraccion automatizada utilizando equipo QIAsymphony.</u>

Nota 8. Antes de inicar el proceso se debe verificar que el Buffer ATL no presente precipitado. En caso necesario colocar de 40º a 70º C por al menos 15 min.

7.5.1 Al tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contiene el botón con células proveniente de las pruebas preliminares agregue 180 ul de buffer ATL a cada tubo con las muestras y a los controles.

7.5.2 Agregue 20ul de proteinasa K y agite en vortex.

7.5.3 Incube en Thermomixer a 56º C por 60 minutos a 900rpm.

7.5.4 Centrifugue por al menos 5 minutos de 12000 a 14000rpm.

7.5.5 Rotule un tubo de 2ml con tapa rosca (para uso en equipo QIASYMPHONY) con al menos el número de OT, el tipo de muestra y las iniciales "CE". Este tubo contendrá lo que corresponde a la fracción epitelial de la muestra en análisis. Rotule además un tubo para las fraccion epitelial del control positivo.

7.5.6 Transfiera 200ul del sobrenadante obtenido en el punto 7.5.4 a cada tubo rotulado con CE.

7.5.7 Dejar al menos 30ul de líquido, manteniendo el botón de células del extracto lo más íntegro posible. En este tubo se tiene lo correspondiente a la fracción espermática de la muestra en análisis.

7.5.8 Agregue de 400 a 500ul de buffer ATL a cada tubo y agite en vortex por al menos 10 segundos para resuspender el botón.

7.5.9 Centrifugue los tubos por al menos 5 minutos de 12000 a 14000rpm.

7.5.10 Descarte el sobrenadante hasta dejar al menos 30ul conteniendo el botón de extracto.

7.5.11 Repetir los puntos 7.5.8 y 7.5.10, al menos 2 veces más.

COPIA NO CONTROLADA

7.5.12 Agregue 160ul de buffer ATL, 20ul de proteinasa K y 20ul de DTT 1M a cada tubo con las muestras y controles y agite en vortex.

7.5.13 Incube en Thermomixer a 56º C por 60 minutos a 900rpm.

7.5.14 Transfiera el contenido de los tubos con la muestra y los controles a tubos de 2ml con rosca (para uso en equipo QIASYMPHONY), previamente rotulados con al menos el número de OT y el tipo de muestra o control.

7.5.15 Coloque los tubos de 2 mL con rosca correspondientes a las fracciones epiteliales y espermáticas en el equipo QIAsymphony y proceda con el protocolo de extracción 200-ADV-HE o similar. (ver procedimiento de Gestión de casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).

7.5.16 Guardar el extracto de 2 a 8 ºC ± 2 ºC

7.5.17 Remitir las muestras para su respectiva cuantificación.

COPIA NO CONTROLADA

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

- En esta fase no es posible obtener resultados pues las muestras, el control negativo y el control positivo de extracción deben de someterse a la cuantificación por PCR en Tiempo Real y a su posterior amplificación.

Acciones Correctivas:

- 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. Estos criterios se encuentran en el Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados.

- El perfil genético del control positivo debe incluirse en la base de perfiles en el software GeneMapper para descarte cuando se analizan las corridas.

- 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 personal.

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 por lo que debe manipularse según normas establecidas.
- Debe asegurarse de limpiar el área de trabajo con algún descontaminante de ADN como ADNasas, DNAway o similar, y posteriormente con etanol al 70%, antes y después de realizar las pruebas.

12 Simbología:

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ATE: indicación comercial.
- AVE: indicación comercial.
- ATL: indicación comercial.
- BQM: Bioquímica
- CE: Células epiteliales
- C.T: Christmas Tree
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses
- DTT: ditiotreitol o reactivo de Clelands
- ºC: grados centigrados
- g: gramos
- L: litros
- M: molar
- ml: mililitros
- mg: miligramos

COPIA NO CONTROLADA

- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción de PCR)
- PON: Procedimiento de Operación Normado
- RNA: Acido Ribonucleico
- r.p.m.: revoluciones por minuto
- SCD: Solicitud de Cambio Documental
- ul: microlitros

13 Terminología:

- **N/A**

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	**Preparación de reactivos**
02	**Preparación de controles**

COPIA NO CONTROLADA

Anexo Número 01

Preparación de reactivos

- **Buffer de lavado**

Mezcle en botella 1 mL de Tris-HCl pH 7,5 (1M), 2 mL de EDTA pH 8 (0,5 M), 1 mL de NaCl 5M, 10 mL de SDS 20% p/v, y 86 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar, en botella de vidrio pirex transparente de 250 mL con tapa.

Autoclave y almacene a temperatura ambiente el que se mantiene en reserva. Siempre antes de utilizar el buffer revise visualmente que el mismo no tenga crecimiento bacteriano.

- **Buffer para PK (50mM Tris-HCL, 10 mM $CaCl_2$)**

Mida 50 mL de Tris-HCl 1M y agregue 1.1 g de $CaCl_2$, ajuste a 100 mL utilizando agua desionizada tipo Milli-Q o similar. Ajuste el pH a 8.

- **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 en cada caso 100 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril. Guarde a temperatura ambiente el que se mantiene en reserva.

- **Cloruro de sodio NaCl 5 M**

Para 1 L disuelva 292,2 g de NaCl en 800 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar. Ajustar el volumen final a 1 L en balón aforado y trasvase a botella de vidrio transparente con tapa. Esterilice por autoclavado. Almacene a temperatura ambiente hasta que se consuma.

- **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.

- **Dithiothreitol 1 M**

Disuelva 0,77 g de DTT en 5 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril en un erlenmeyer de 20 mL.

Puede ayudar a que se disuelva la disolución más rápido si la incuba por 10 minutos a 37 °C en baño maría. No autoclave. Alicuote en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, nuevos y estériles

COPIA NO CONTROLADA

en volúmenes de 500 uL. Mantenga en congelación en temperaturas cercanas a -20 ºC para asegurar la estabilidad del reactivo. Descongele cuando vaya a utilizarlo y mantenga en hielo escarchado. Guarde lo que no se consuma nuevamente en congelación.

Utilice una balanza analítica para pesar el DTT.

- **EDTA 0,5 M pH 8**

Pese 186,1 g EDTA disódico, coloque en un beaker de 1 L y agregue 800 mL de agua Tipo Milli-Q o similar, ajuste el pH 8 con perlas de NAOH, luego afore a 1 L en un balón aforado, trasvase a botella de vidrio trasparente y autoclave.

Nota: El EDTA no se disuelve hasta que se ajuste el pH. Ajuste el volumen a 1 L con agua tipo Milli-Q o similar.

Almacene a temperatura ambiente y hasta que la solución no presente turbidez.

- **Proteínasa K (20 mg/mL)**

Reconstituya los 100 mg del envase de Proteínasa K en 5 mL de buffer para PK. Se agita hasta disolverlo completamente. Prepare alícuotas de 50 y 150 ul en tubos para microcentrífuga de 1,5 mL nuevo y estériles rotulados con nombre del reactivo, y almacene a -20°C por 3 meses como máximo. Indique la fecha de preparación en la caja en las que se almacenen las alícuotas. Descongele cuando vaya a utilizarlo, mantenga en hielo escarchado hasta su uso.

- **SDS 20%**

Use mascarilla para pesar el SDS.

Para pesar utilice una balanza granataria.

Disolver lentamente 200,00 g de dodecil-sulfato de sodio en 800 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril. Para ayudar a que se disuelva, la solución puede calentarse. Ajustar a 1 L en balón aforado, trasvasar a botella de vidrio transparente de 1 Litro con tapa. Recordar que se puede calentar la solución a 60ºC por 20 minutos.

- **Tris-HCl, pH 7,5 (1 M)**

Para 100 mL pese 12,11 g de Tris-base, agregue 80 mL de agua desionizada tipo Milli-Q o similar, para 1 L pese 121, 1 g de tris-base, agregue 800 mL de agua desionizada tipo Milli-Q similar.

Ajuste el pH a 7,5 usando un medidor de pH a temperatura ambiente agregando HCl concentrado (aprox. 65 mL para 1 litro).

Ajuste el volumen final con agua desionizada tipo Milli-Q o similar en balón aforado y trasvase a botella de vidrio transparente con tapa. Esterilice autoclavando.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 02

Preparación de controles

Control positivo

Entregar aplicadores a una compañera administrativa o persona que no participe en análisis para que los impregne con saliva. Secar por al menos 24h en cámara. Realizar una dilución 1/50 con muestra de semen con agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril. Las muestras de semen utilizadas son las recolectadas por los pacientes que se realizan espermogramas en esta Sección cuyo conteo de espermatozoides es de al menos $15X10^6$ esp/ml. Agregar 100 ul a cada aplicador seco con saliva. Secar por al menos 24h en cámara. Recortar individualmente un tubo por aplicador o máximo 2 tubos por aplicador y rotular con el # de lote. Almacenar en refrigeración. La preparación de estos controles se deberá registrar en el "Formulario para Reactivos Preparados". Al final se cuantifica el control para dar su aprobación.

Control negativo

Utilice un blanco de reactivos, utilice agua tipo Milli-Q estéril o buffer ATL en caso de utilizar metodología automatizada como control negativo.

COPIA NO CONTROLADA