ISSN 2953-6367
http://revistainvestigo.com

Octubre 2026
Vol. 7 No. 21, PP. 436-465
https://doi.org/10.56519/aewee134

IMPORTANCIA DE LA TINCIÓN CHRISTMAS TREE EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

THE IMPORTANCE OF THE CHRISTMAS TREE STAINING METHOD IN THE IDENTIFICATION OF SPERMATOZOA

Madelyn Liset Martínez Cevallos[1], Verónica Paulina Cáceres Manzano[2]

{madelynl.martinez@unach.edu.ec[1], vcaceres@unach.edu.ec[2]}

Fecha de recepción: 05/10/2026 / Fecha de aceptación: 08/10/2026 / Fecha de publicación: 14/10/2026

RESUMEN: La identificación microscópica de espermatozoides es un tipo de análisis aplicado a evidencias asociadas con agresiones sexuales, especialmente cuando las muestras contienen mezclas celulares, poca carga espermática o signos de degradación. Entre los métodos disponibles, la tinción Kernechtrot–picroindigocarmine (KPIC), también conocida como Christmas Tree, facilita la distinción morfológica de la cabeza y la cola del espermatozoide mediante una coloración contrastante. Esta revisión tuvo como objetivo evaluar y sintetizar la evidencia científica existente sobre la utilidad analítica y operativa de la tinción KPIC para la detección microscópica de espermatozoides. Se llevó a cabo una revisión sistemática siguiendo el protocolo PRISMA 2020 y al marco PICOS. Se consultó las bases de datos Scopus, PubMed, Web of Science y Google Scholar, sin restricción de año o idioma. Se recuperó 95 registros iniciales, se eliminó 38 duplicados, se examinó 57 publicaciones y se incluyeron 13 estudios después de la evaluación a texto completo. Los resultados indicaron que KPIC es eficaz para reconocer espermatozoides, ya sean escasos, diluidos, fragmentados, presentes en fondos celulares complejos. No obstante, la heterogeneidad metodológica impidió estimar métricas combinadas de sensibilidad, especificidad y exactitud. La cantidad y calidad de las células observables se vieron afectadas por factores como el tiempo, el tipo de sustrato, la eficiencia de recuperación y la presencia de contaminantes. En comparación con otros métodos, KPIC mostró ventajas de costo, accesibilidad, contraste morfológico y compatibilidad con análisis genéticos posteriores, mientras que su dependencia del observador y la menor automatización fueron limitaciones. En conclusión, KPIC sigue siendo útil para identificar células espermáticas, pero debe complementarse con marcadores seminales, medidas de control de calidad y análisis genéticos para fundamentar una interpretación forense contextualizada.

[1]Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH); Maestría en Diagnóstico de Laboratorio Clínico y Molecular con mención en Bioquímica Clínica, https://orcid.org/0009-0001-1635-4562
[2]Universidad Nacional Chimborazo (UNACH), https://orcid.org/0000-0001-5710-5661

Palabras clave: Agresión sexual; espermatozoides; identificación forense; Kernechtrot-picroindigocarmín; semen; árbol de navidad tinción

ABSTRACT: Microscopic sperm identification is a type of analysis applied to evidence associated with sexual assault, especially when samples contain cell mixtures, low sperm load, or signs of degradation. Among the available methods, Kernechtrot–picroindigocarmine (KPIC) staining, also known as Christmas Tree, facilitates the morphological distinction of the sperm head and tail by contrasting coloration. This review aimed to evaluate and synthesize the existing scientific evidence on the analytical and operational utility of KPIC staining for microscopic sperm detection. A systematic review was conducted following the PRISMA 2020 protocol and the PICOS framework. Scopus, PubMed, Web of Science, and Google Scholar databases were consulted, with no year or language restriction. 95 initial records were retrieved, 38 duplicates were removed, 57 publications were examined, and 13 studies were included after full-text evaluation. The results indicated that KPIC is effective in recognizing sperm, whether scarce, diluted, fragmented, present in complex cell backgrounds. However, methodological heterogeneity prevented estimating combined metrics of sensitivity, specificity, and accuracy. The quantity and quality of observable cells were affected by factors such as time, substrate type, recovery efficiency, and the presence of contaminants. Compared to other methods, KPIC showed advantages in cost, accessibility, morphological contrast, and compatibility with subsequent genetic analyses, while its observer dependence and reduced automation were limitations. In conclusion, KPIC is still useful for identifying sperm cells, but it should be complemented with seminal markers, quality control measures, and genetic analyses to support contextualized forensic interpretation.

Keywords: Sexual Assault; sperm; forensic identification; Kernechtrot picroindigocarmine; semen; christmas tree stain

INTRODUCCIÓN

La biología forense es un campo interdisciplinario que utiliza conocimientos celulares, bioquímicos y moleculares en el análisis de pruebas biológicas vinculados con hechos investigativos. A partir de esta información se puede establecer la naturaleza y el tejido procedente de una evidencia. Así que, se debe elegir el método analítico más adecuado para asegurar unos resultados fiables (1,2). Mientras que el análisis de ADN puede vincular una muestra con un individuo, determinar su naturaleza biológica posibilita establecer si el material analizado es compatible con sangre, saliva, semen u otro tejido (3,4). Este dato es particularmente relevante en la investigación de delitos sexuales, donde las muestras suelen contener mezclas de células del presunto agresor y de la víctima (5).

La detección de semen o espermatozoides contribuye a corroborar la existencia de contacto sexual, seleccionar las muestras con mayor potencial probatorio y definir la estrategia de separación celular y análisis genético más apropiada (6,7). El semen es una matriz biológica heterogénea integrada por una fracción celular, constituida principalmente por

espermatozoides y otras células presentes en el tracto reproductor, y una fracción acelular o plasma seminal, que contiene proteínas, enzimas y otros componentes secretados por las glándulas sexuales accesorias. Esta distinción es analíticamente relevante, dado que las pruebas forenses pueden dirigirse a componentes diferentes: la microscopía busca espermatozoides, mientras que los ensayos bioquímicos, inmunológicos o moleculares detectan sustancias del plasma seminal o marcadores cuya expresión se asocia con células espermáticas o tejido prostático (6,8).

Las muestras procedentes de delitos sexuales rara vez presentan condiciones ideales (recolectada oportunamente, procedimiento adecuado, cantidad suficiente, sustrato de fácil recuperación), pues pueden contener pocos espermatozoides, abundantes células epiteliales, microorganismos, lubricantes, sangre menstrual, residuos del soporte y otros materiales capaces de interferir en su examen (5,9). A ello se suman la dilución, el lavado, la degradación, el tiempo transcurrido desde la deposición y las variaciones biológicas del donante, como oligospermia, azoospermia, infertilidad o vasectomía. Se ha demostrado que la condición de infertilidad puede interferir en el funcionamiento de los paneles de ARN mensajero dirigidos a los marcadores seminales o espermáticos, por lo que ningún marcador aislado representa de forma uniforme todas las condiciones biológicas del semen (8).

La evaluación forense del semen normalmente se lleva a cabo como un proceso secuencial y complementario que incluye la exposición de posibles manchas, la aplicación de pruebas de orientación, la identificación de componentes seminales o espermatozoides y, por último, el análisis genético. Las fuentes de luz, como UV-A y bandas visibles violeta, azul o azul-verde, pueden facilitar la localización inicial de áreas sospechosas, aunque la fluorescencia no es exclusiva del semen y depende del sustrato, de la antigüedad y de las condiciones de la muestra (10). La prueba de fosfatasa ácida se utiliza como ensayo presuntivo porque esta enzima se encuentra en concentraciones elevadas en el plasma seminal, sin embargo, también puede estar presente en otros materiales biológicos y su actividad puede disminuir por degradación, lavado o exposición química, por lo que un resultado positivo requiere evaluación posterior y uno negativo no excluye semen (11,12).

Los ensayos inmunocromatográficos y la tinción Christmas Tree responden a preguntas analíticas diferentes dentro del examen forense. En el esquema operativo del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, la detección de P30 o antígeno prostático específico se emplea para determinar cualitativamente la presencia de líquido seminal, incluso en muestras procedentes de individuos azoospérmicos o vasectomizados; se considera positivo un resultado con concentraciones superiores a 4 ng/mL. No obstante, un resultado negativo puede deberse a una concentración inferior al umbral de detección o al efecto prozona ocasionado por concentraciones elevadas de P30, mientras que la orina masculina, especialmente la obtenida después de la eyaculación, puede producir resultados positivos (3,6).

En contraste, la tinción Christmas Tree es un método para demostrar la presencia de espermatozoides a través de la identificación de sus particularidades morfológicas: núcleo rojo

intenso, acrosoma rosado pálido y cola verde. No obstante, el procesamiento y la degradación de las muestras pueden ocasionar morfologías atípicas o la pérdida de la cola, por lo que su interpretación debe ser realizada por personal calificado y experimentado. Así, un resultado positivo para P30 junto con microscopía negativa no siempre constituye una discordancia, sino que puede reflejar la presencia de plasma seminal sin espermatozoides detectables. La interpretación forense, primero, debe reunir las observaciones de ambos ensayos junto con las características y las condiciones de la muestra antes de que se lleve a cabo un análisis genético que ofrezca evidencia de los posibles orígenes de dicho material biológico (4,13).

Se destaca la tinción de Kernechtrot–picroindigocarmine, conocida también como KPIC o tinción Christmas Tree, entre los métodos citológicos empleados para facilitar la visualización de espermatozoides. Este procedimiento se realiza a través del uso de Nuclear Fast Red, que también se le llama Kernechtrot y picroindigocarmine: el primer reactivo tiñe de rojo el material nuclear, mientras que el segundo genera tonalidades verdes o azul-verdosas en el citoplasma, las membranas celulares y la cola espermática (14). La identificación no depende únicamente del color, sino de la valoración conjunta del tamaño, la forma ovalada y aplanada de la cabeza, la diferenciación acrosómica, el punto de inserción del cuello y la presencia eventual de la pieza intermedia y la cola (7,15).

La principal utilidad forense de KPIC reside en que permite observar directamente estructuras celulares compatibles con espermatozoides y estimar su abundancia antes de seleccionar procedimientos posteriores. Los primeros estudios de dilución demostraron que la tinción podía facilitar la detección de espermatozoides presentes en concentraciones reducidas cuando se realizaba una búsqueda microscópica sistemática, mientras que su comparación con hematoxilina-eosina y fucsina alcalina mostró un mejor desempeño relativo durante las primeras 72 horas posteriores al contacto sexual (14,15). En los flujos analíticos actuales, el número de espermatozoides observados puede orientar la decisión entre extracción diferencial, procesamiento conjunto de la muestra o priorización de marcadores del cromosoma Y, con el propósito de reducir la pérdida de ADN masculino y mejorar la resolución de mezclas (7,16).

La microscopía también ha conservado utilidad en materiales sometidos a condiciones adversas. Se han observado espermatozoides después del lavado repetido de tejidos y tras la desinfección con ozono, incluso cuando algunas pruebas presuntivas o inmunológicas redujeron su respuesta (11,12). Asimismo, se ha recuperado ADN de portaobjetos históricos previamente teñidos, lo que muestra que estos preparados pueden mantener valor probatorio en investigaciones retrospectivas (17). Sin embargo, un resultado microscópico positivo identifica material espermático, no individualiza al donante, en sentido inverso, un resultado negativo no descarta plasma seminal ni la posible recuperación de ADN masculino (13).

El desempeño de la tinción está condicionado por variables biológicas, ambientales y operativas. La probabilidad de encontrar espermatozoides disminuye cuando existe una concentración celular baja, ha transcurrido un periodo prolongado desde el contacto o las células han sufrido degradación y separación de la cabeza y la cola. Además, la presencia abundante de células

epiteliales, bacterias, levaduras, detritos y precipitados de tinción puede dificultar la discriminación visual (9,15). La coloración tampoco es específica de especie: los espermatozoides caninos, por ejemplo, pueden captar KPIC y mostrar un patrón parcialmente semejante al humano, aunque existan diferencias morfológicas y cromáticas que permitan su diferenciación por un examinador competente (18).

El soporte y las condiciones posteriores a la deposición también modifican la recuperación, pues el tipo de tejido, la densidad de la trama, el detergente, la temperatura y el número de ciclos de lavado influyen en la retención de espermatozoides y pueden originar muestras microscópicamente positivas pese a resultados negativos de fosfatasa ácida o PSA (12,19). A estas limitaciones se añaden el tiempo requerido para examinar todo el portaobjetos, la fatiga visual y la variabilidad asociada con la experiencia del observador, especialmente cuando existen entre uno y cinco espermatozoides en toda la preparación (7).

La investigación reciente se ha orientado a complementar la tinción convencional mediante métodos más sensibles, objetivos y automatizables. En el campo de la microscopía, se han desarrollado plataformas capaces de escanear portaobjetos teñidos con Christmas Tree y clasificar imágenes mediante redes neuronales profundas, una validación reciente del sistema Metafer informó una sensibilidad de 0.99, una especificidad de 0.99 y una exactitud de 0.99 dentro del conjunto evaluado, aunque todavía se observaron clasificaciones falsas positivas y falsas negativas que justifican la revisión experta (7). De manera similar, el sistema Spitz empleó un modelo YOLO entrenado con imágenes de casos forenses teñidas con KPIC e incorporó reconstrucción espacial y verificación humana de las células detectadas (20).

Paralelamente, se investigan técnicas dirigidas a componentes del plasma seminal o a su expresión molecular, entre ellas la espectrometría de masas de péptidos de semenogelina, los paneles de ARN mensajero y microARN y los sistemas avanzados de separación celular (5,6,8,21). Estos enfoques buscan aumentar la especificidad, reducir el tiempo de análisis y preservar una mayor cantidad de material para la elaboración de perfiles genéticos.

A pesar del uso continuo de la tinción KPIC en los protocolos de biología forense, la evidencia disponible sobre su rendimiento presenta limitaciones importantes. Son escasos los estudios recientes dedicados específicamente a validar KPIC y existe una marcada heterogeneidad en los tipos de muestras, procedimientos de tinción, criterios morfológicos, escalas de cuantificación y métodos de referencia empleados, lo que dificulta comparar resultados y establecer estimaciones consistentes de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (4,7). Aunque algunas investigaciones han examinado su comportamiento frente al lavado, la degradación o la exposición química, todavía no se conoce con suficiente precisión cómo interactúan el tiempo transcurrido, el método de recolección, el almacenamiento, el transporte, el sustrato y las condiciones ambientales en situaciones representativas de la práctica forense (11,12,19).

Esta incertidumbre adquiere especial relevancia en laboratorios con recursos limitados, donde las condiciones logísticas, la disponibilidad de personal especializado y el acceso a tecnologías

complementarias pueden ser diferentes de aquellos en los que se han llevado a cabo las principales verificaciones. También, son insuficientes las comparaciones integrales entre KPIC y pruebas inmunológicos, moleculares, fluorescentes o automatizados en términos de desempeño analítico, tiempo de procesamiento, costo, conservación de la muestra y posible análisis subsiguiente a ADN (5–7).

El presente estudio tiene como objetivo general evaluar y sintetizar la evidencia científica disponible sobre la utilidad analítica y operativa de la tinción Kernechtrot–picroindigocarmine para la detección microscópica de espermatozoides en muestras relacionadas con investigaciones de agresiones sexuales.

Para ello, se plantean las siguientes preguntas de investigación: (1) ¿Qué desempeño analítico ha demostrado la tinción KPIC en muestras forenses o experimentalmente representativas?; (2) ¿Cómo influyen el tiempo transcurrido desde la deposición o recolección, el procedimiento de toma de muestra, el almacenamiento, el transporte, el tipo de sustrato y la exposición ambiental en sus resultados?; (3) ¿Qué ventajas y desventajas presenta frente a otras técnicas microscópicas, inmunológicas, moleculares, fluorescentes o automatizadas?

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura sobre la utilidad de la tinción KPIC siguiendo las recomendaciones de la declaración Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA 2020), con el propósito de asegurar la transparencia y reproducibilidad de los procesos de identificación, selección, evaluación y síntesis de la evidencia (22). La formulación de los criterios de elegibilidad y la organización de las preguntas de investigación se realizaron mediante el marco PICOS, cuyos criterios se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios PICOS.

Ejes temáticos	Criterios
P: Población o muestra	Muestras biológicas humanas analizadas en contexto forense o en condiciones experimentales representativas para la identificación de espermatozoides. Se admitieron también muestras seminales procedentes de estudios andrológicos sobre criptozoospermia, oligozoospermia severa o diagnóstico inicial de azoospermia, cuando aportaron datos sobre la detección de espermatozoides escasos mediante la tinción Christmas Tree.
I: Intervención o prueba índice	Aplicación de la tinción Christmas Tree, Kernechtrot–picroindigocarmine, KPIC, Nuclear Fast Red/Picroindigocarmine o denominaciones equivalentes para la identificación microscópica de espermatozoides.
C: Comparador	Otras técnicas microscópicas utilizadas para detectar espermatozoides
O: Resultados	Desempeño de la tinción Christmas Tree en la identificación y diferenciación morfológica de espermatozoides, incluyendo su capacidad de detección en

	muestras con baja concentración espermática. Se consideraron los límites de detección cuando fueron expresamente cuantificados y, en los estudios andrológicos, la identificación de espermatozoides escasos mediante procedimientos de concentración de la muestra combinados con tinción.
S: Diseños de estudio	Estudios primarios que evalúen el desempeño, utilidad, reproducibilidad, aplicación o factores modificadores de KPIC.

Criterios de elegibilidad

Se incluyeron investigaciones primarias a la fecha de búsqueda (21/09/2026), las cuales evaluaron la aplicación de la tinción Christmas Tree o alguna de sus denominaciones equivalentes para la identificación de espermatozoides en muestras forenses humanas. Los estudios deben describir el procedimiento de tinción y comunicar al menos un resultado relacionado con su desempeño analítico, capacidad de detección, interpretación morfológica, reproducibilidad, condiciones preanalíticas, exposición ambiental, limitaciones técnicas o comparación con otra técnica microscópica. No se aplicó restricciones por año de publicación ni por idioma.

Se excluyeron revisiones narrativas, sistemáticas, metaanálisis, editoriales, cartas, comentarios, protocolos, capítulos de libro o libros completos, resúmenes de congresos y documentos que no presenten resultados empíricos originales. También se descartaron los estudios que no evalúen la tinción KPIC desde una perspectiva forense o analítica, las investigaciones efectuadas únicamente con muestras animales y los estudios sobre otras tinciones o pruebas de semen que no incorporen KPIC. Así mismo, no se contaron las publicaciones que no tenían información suficiente para determinar las características de las muestras, el procedimiento aplicado o los resultados obtenidos, además de las publicaciones sin acceso al texto completo.

Fuentes de información y estrategia de búsqueda

La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo en Scopus, PubMed, Web of Science y Google Scholar, bases de datos seleccionadas por su amplia cobertura de literatura biomédica, forense y multidisciplinaria. La estrategia se estructuró en base a dos categorías conceptuales relevantes: “Christmas Tree” y “sperm”. Los términos se combinaron mediante el operador booleano OR dentro de cada categoría y mediante AND entre ambas categorías.

En Scopus, PubMed y Web of Science, la búsqueda se aplicó a los campos de título, resumen y palabras clave o a sus equivalentes. En Google Scholar, la revisión se limitó a los primeros 50 resultados recuperados, que se incorporaron al proceso de cribado y evaluación de elegibilidad. Las estrategias que se utilizaron en las cuatro fuentes de información se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Estrategias de búsqueda.

Base de datos	Cadena de búsqueda	Nro. de estudios
Scopus	(TITLE-ABS-KEY ("Christmas Tree" OR "Christmas Tree stain*" OR "Christmas-tree stain*" OR "Kernechtrot-picroindigocarmine" OR "Kernechtrot picroindigocarmine" OR "KPIC*" OR "picroindigocarmine nuclear fast red" OR "PIC/NF" OR "PIC-NF" OR "PIC NF" OR "NF/PIC" OR "NF-PIC" OR "NF PIC") AND TITLE-ABS-KEY (sperm* OR semen OR seminal OR "seminal fluid*"))	20
PubMed	("Christmas Tree"[Title/Abstract] OR "Christmas Tree stain*"[Title/Abstract] OR "Christmas-tree stain*"[Title/Abstract] OR "Kernechtrot-picroindigocarmine"[Title/Abstract] OR "Kernechtrot picroindigocarmine"[Title/Abstract] OR "KPIC*"[Title/Abstract] OR "picroindigocarmine nuclear fast red"[Title/Abstract] OR "PIC/NF"[Title/Abstract] OR "PIC-NF"[Title/Abstract] OR "PIC NF"[Title/Abstract] OR "NF/PIC"[Title/Abstract] OR "NF-PIC"[Title/Abstract] OR "NF PIC"[Title/Abstract]) AND (sperm*[Title/Abstract] OR semen[Title/Abstract] OR seminal[Title/Abstract] OR "seminal fluid*"[Title/Abstract])	13
Web of Science	(TS=("Christmas Tree" OR "Christmas Tree stain*" OR "Christmas-tree stain*" OR "Kernechtrot-picroindigocarmine" OR "Kernechtrot picroindigocarmine" OR "KPIC*" OR "picroindigocarmine nuclear fast red" OR "PIC/NF" OR "PIC-NF" OR "PIC NF" OR "NF/PIC" OR "NF-PIC" OR "NF PIC") AND TS=(sperm* OR semen OR seminal OR "seminal fluid*"))	12
Scholar	("Christmas Tree" OR KPIC OR Kernechtrot) (sperm OR semen)	50
	Total	95

Proceso de selección de estudios

El desarrollo de la búsqueda y selección se realizó en fases consecutivas de acuerdo al flujo de PRISMA 2020. En la fase de identificación, se recogieron y exportaron todas las referencias recuperadas en las bases de datos seleccionadas. Posteriormente, se identificaron y eliminaron los registros duplicados. En el cribado, se revisó los títulos y resúmenes, aplicando los criterios de inclusión y exclusión. En la fase de elegibilidad, se evaluó de manera independiente el texto completo de las publicaciones, seleccionando aquellas que se consideren pertinentes. Las discrepancias se resolvieron con el consenso de las partes.

Evaluación del riesgo de sesgo

La calidad metodológica de los estudios se evalúo mediante herramientas estandarizadas seleccionadas de acuerdo con el diseño de cada investigación. Los estudios de precisión o exactitud diagnóstica fueron valorados mediante la herramienta QUADAS-2. Los estudios observacionales retrospectivos y observacionales analíticos se evaluaron con la Newcastle–Ottawa Scale (NOS). Para los estudios experimentales de laboratorio in vitro orientados al análisis de variables experimentales, se utilizó la herramienta JBI para estudios analíticos de laboratorio. Por último, los estudios experimentales metodológicos y comparativos de laboratorio enfocados en la evaluación de la exactitud diagnóstica fueron examinados mediante el JBI for Diagnostic Test Accuracy Studies. La selección de cada instrumento se realizó según el propósito, diseño y tipo de resultados reportados por cada estudio.

Extracción y síntesis de la información

La información fue extraída mediante una matriz estandarizada en Excel. Para cada uno de los estudios se registró autor, año de publicación, país, contexto (forense o experimental), diseño, tamaño y procedencia de la muestra, tipo de muestra biológica, composición, sustrato utilizado, tiempo transcurrido, procedimiento de toma de muestra, condiciones y duración del almacenamiento, transporte, exposición ambiental y otras condiciones de degradación, reactivos, fijación, protocolo de tinción, tiempos de procesamiento, criterios de positividad, controles positivos y negativos, resultados de desempeño, sensibilidad, especificidad, exactitud, límite de detección, concordancia y reproducibilidad, dificultades interpretativas, tiempo, costo, requerimientos técnicos, consumo de muestra, compatibilidad con pruebas genéticas posteriores, conclusiones y limitaciones.

Como consecuencia de la variedad de los diseños, muestras, condiciones experimentales, comparadores y medidas de resultado, se llevó a cabo una síntesis narrativa y temática de los hallazgos. Inicialmente, las características y resultados de los estudios se organizaron a través de tablas descriptivas. Posteriormente, la evidencia se organizó en cuatro temas relacionados con las preguntas de investigación: desempeño analítico de KPIC; influencia de las condiciones preanalíticas y ambientales; limitaciones, fuentes de error y dificultades de interpretación; y ventajas y desventajas frente a otras técnicas microscópicas.

RESULTADOS

Selección de estudios

La búsqueda bibliográfica permitió identificar 95 registros procedentes de cuatro fuentes de información: Scopus 20, PubMed 13, Web of Science 12 y Google Scholar 50. Después de eliminar 37 registros duplicados, se sometieron a cribado 58 publicaciones mediante la revisión de sus títulos, resúmenes y palabras clave. En esta fase se excluyeron 43 registros por no cumplir los criterios de elegibilidad, no aportar información pertinente sobre la tinción Christmas Tree o no contribuir a responder las preguntas de investigación. En consecuencia, se solicitaron para recuperación 14 publicaciones potencialmente relevantes, de las cuales 1 no pudo obtenerse a

texto completo.

Los 13 artículos recuperados fueron evaluados íntegramente para determinar su elegibilidad, constituyéndose en el corpus primario para la síntesis. El proceso de identificación, cribado, elegibilidad e inclusión de los estudios se presenta en el diagrama de flujo PRISMA 2020 (Figura 1).

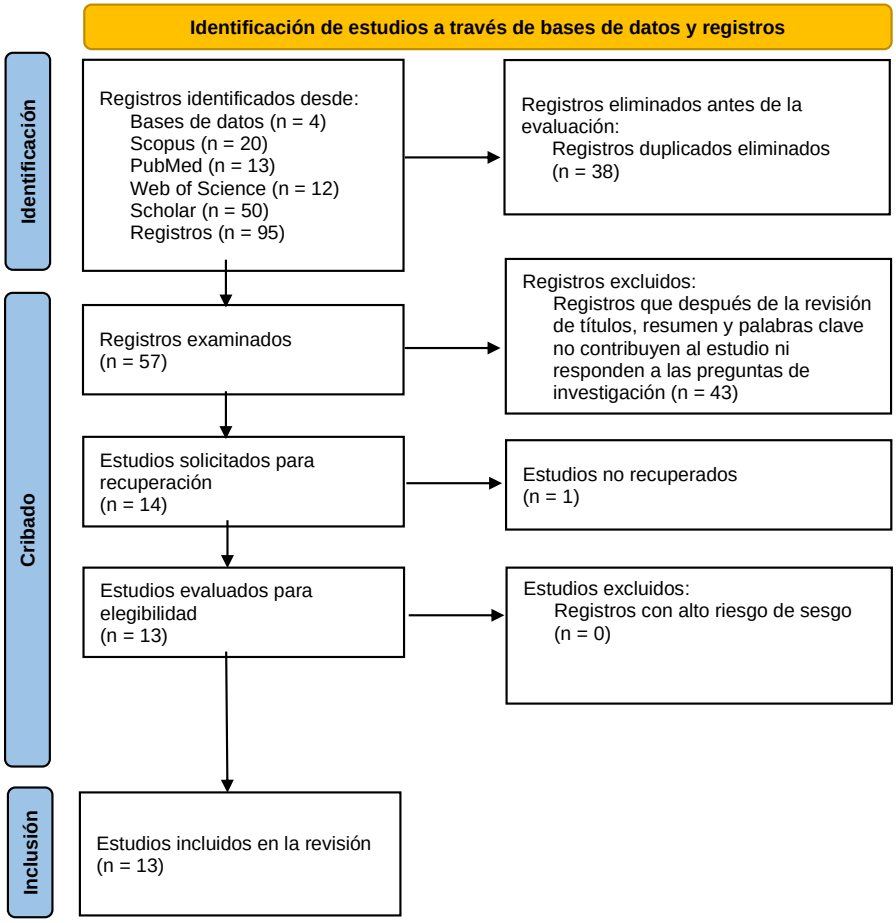


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA 2020

Riesgo de sesgo

La figura 2 presenta la síntesis de la evaluación del riesgo de sesgo de los 13 estudios incluidos, realizada mediante QUADAS-2, NOS y las herramientas de evaluación crítica del Joanna Briggs Institute (JBI), según el diseño de cada investigación.

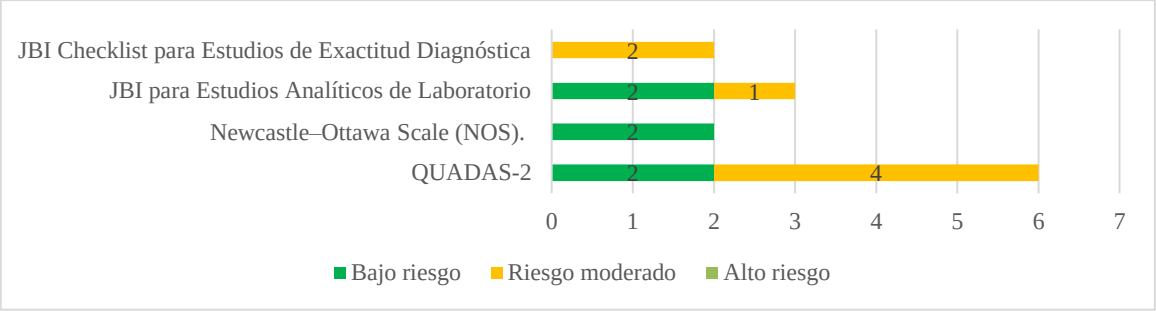


Figura 2. Síntesis de la evaluación del riesgo de sesgo

Características de los estudios

Las características generales de los estudios incluidos se presentan en la Tabla 3. Para cada investigación se presenta el autor y año de publicación, el país de procedencia, el contexto de aplicación, el diseño metodológico, el tamaño y origen de la muestra, el tipo de material biológico examinado y el sustrato utilizado.

Tabla 3. Características de los estudios.

Autor(es)	País	Contexto	Diseño del Estudio	Tamaño y Procedencia de la Muestra	Tipo de Muestra Biológica	Sustrato Utilizado
Athira et al.(23)	India	Forense / Experimental	Experimental in vitro	1 donante sano (consentimiento informado)	Semen eyaculado con contaminantes	Tela de algodón blanca
Monteiro et al. (24)	Brasil	Andrológico / Clínico	Observacional retrospectivo	148 pacientes con azoospermia no obstructiva	Semen eyaculado (sedimento)	Portaobjetos de vidrio (área 2-4 cm^2)
Allery et al. (15)	Francia	Forense / Clínico	Experimental de precisión diagnóstica comparativa	174 mujeres en centro de infertilidad	Muestras/hisopos cervicovaginales	Hisopos / portaobjetos de vidrio
Panicker et al. (25)	India	Forense / Experimental	Experimental in vitro	1 donante voluntario (48 muestras de tela)	Semen humano depositado (200 µL)	Algodón, Nylon y Denim (8x8 cm)
Simons & Vintiner (26)	Nueva Zelanda	Forense / Experimental	Experimental in vitro	1 donante femenina (6 láminas por grupo)	Células epiteliales vaginales	Portaobjetos de vidrio y Poly-L-lisina
Fejes et al. (11)	Hungría	Forense / Experimental	Experimental in vitro	Donantes sanos	Semen, sangre y saliva (puros y diluidos)	Portaobjetos de vidrio y sábana algodón
Hendin et al. (27)	Estados Unidos	Andrológico / Clínico	Observacional analítico	20 hombres con falla	Semen eyaculado (falla	Portaobjetos en

				espermatogénica; 10 controles CBAVD	espermatogénica)	citocentrífuga Cytospin
Sharma et al. (28)	Estados Unidos	Andrológico / Clínico	Observacional retrospectivo de precisión diagnóstica	251 hombres con azoospermia; 46 a mTESE	Semen eyaculado (pellet resuspendido)	Portaobjetos esmerilados Cytospin 4 (32 mm^2)
Leubitz & Savage (14)	Estados Unidos	Forense / Experimental	Experimental de dilución	6 ejaculados frescos; 6 oligospérmicos y 3 azoospérmicos	Semen humano fresco (<4 h)	Portaobjetos (frotis directo e hisopo)
Humanes et al. (20)	Brasil	Forense	Estudio comparativo de precisión diagnóstica	399 parches (IA); 30 casos reales (3 peritos)	Extractos de hisopos/ropa de agresión sexual	Portaobjetos de vidrio montados
Mitchell (29)	Estados Unidos	Forense	Experimental de validación	Hisopos orales, vaginales, rectales, postcoitales y 10 casos reales	Semen puro/diluido y muestras animales	Portaobjetos de vidrio (raspado en agua)
Alger et al. (30)	Estados Unidos	Forense	Experimental metodológico	376 láminas de casos reales de agresión sexual	Extractos de hisopos/cortes de tela reales	Portaobjetos con anillo de enfoque blanco
Grosjean & Castella (31)	Suiza	Forense	Experimental comparativo	Hisopos Copan FLOQSwabs (voluntarias y casos reales)	Semen diluido (1:20-1:1000) y mezclas biológicas	Hisopos Copan; láminas IFI vs SuperFrost

Los hallazgos muestran estudios publicados entre 1984 y 2026 y procedentes de 7 países, con una mayor representación de Estados Unidos (n = 5), seguido de India y Brasil (n = 2 cada uno). Predominó las investigaciones desarrolladas en un contexto forense (n = 10), mientras que 3 correspondieron al ámbito andrológico o clínico. Asimismo, 10 estudios emplearon diseños experimentales, comparativos o de validación y tres utilizaron diseños observacionales.

Las muestras fueron heterogéneas, las cuales comprendieron desde experimentos con un único donante hasta evaluaciones de 251 pacientes, 376 láminas de casos reales y 399 parches de imagen. Aunque el portaobjetos de vidrio fue el soporte más utilizado, también se analizaron hisopos y diferentes tejidos. Los materiales biológicos incluyeron semen fresco, diluido, contaminado o procedente de pacientes con alteraciones espermatogénicas, muestras cervicovaginales, células epiteliales, mezclas con sangre y saliva, y evidencia recuperada de agresiones sexuales.

La Tabla 4 sintetiza el desempeño analítico de la tinción KPIC, considerando las características de las muestras y las unidades de análisis, las condiciones de aplicación y los criterios de positividad, los estándares de referencia y controles, los resultados primarios, las medidas de

sensibilidad, especificidad y exactitud, los límites empíricos de detección y la reproducibilidad. Debido a la heterogeneidad de los diseños y desenlaces, se diferenciaron las medidas formales de exactitud diagnóstica de las proporciones de detección, los incrementos respecto de otros procedimientos y los resultados de sistemas automatizados, evitando interpretar estos indicadores como métricas equivalentes.

Tabla 4. Desempeño analítico de la tinción KPIC en las muestras evaluadas.

Autor(es)	Aplicación de KPIC y criterio de positividad	Estándar de referencia y controles	Datos primarios de desempeño	Sensibilidad, especificidad y exactitud	Límite de detección y otros resultados analíticos
Athira et al. (23)	Secado al aire/calor; Nuclear Fast Red durante 20 min y picroindigocarmine durante 15 - 20 s. Lectura a 1000×; Positivo: cabeza roja/rosa y cola verde.	DAPI como comparador principal; luminiscencia UV y prueba de Florence. Control positivo: semen sin contaminantes. Controles negativos: tejidos tratados solo con agua o detergentes.	KPIC permitió observar espermatozoides en todas las condiciones contaminadas evaluadas, aunque la densidad celular disminuyó con el tiempo. DAPI mantuvo una detección más constante en las muestras con mayor contaminación.	Sensibilidad, especificidad y exactitud: NR.	Se observaron células dispersas después de 30 días; no se determinó un límite de detección cuantitativo.
Monteiro et al. (24)	Microcentrifugación del sedimento; fijación con etanol durante 15 min; Nuclear Fast Red durante 15 min y picroindigocarmine durante 15 s. Positivo: región postacrosómica roja, acrosoma rosa claro y cola verde-azulada.	Análisis seminal conforme a OMS 2010. No se reportó controles positivos o negativos específicos.	KPIC después de la microcentrifugación detectó espermatozoides en 21/148 muestras (14,2%) previamente clasificadas como azoospérmicas, que fueron reclasificadas como criptozoospérmicas.	Sensibilidad, especificidad y exactitud: NE.	Detección de un espermatozoide aislado en el sedimento procesado. No se estableció una concentración mínima.
Allery et al. (15)	Secado al aire y fijación en alcohol-éter. Positivo: presencia de espermatozoides a 400×; recuento medio en 100 campos.	Comparación directa con hematoxilina-eosina y fucsina alcalina. Lectura ciega de las láminas.	Detección: KPIC 61/174 (35,1 %), H&E 60/174 (34,7 %) y fucsina alcalina 49/174 (28,4 %). Media de espermatozoides/campo: 8,3 con KPIC, 4,6 con H&E (p = 0,023) y 4,2 con fucsina (p = 0,017). Entre 12–72 h: 9,1 espermatozoides/campo con KPIC frente a 2,6 con H&E.	Sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica: NR.	Ningún método detectó espermatozoides después de 72 h postcoito; este resultado corresponde a una ventana temporal observada, no a un límite analítico de concentración.
Panicker et al.	Fijación por calor; rojo neutro durante 15 min y	Fluorescencia mediante VSC-6000/HS y prueba	La densidad espermática disminuyó con la antigüedad de la	Sensibilidad, especificidad y exactitud	Se mantuvo positividad microscópica hasta

Autor(es)	Aplicación de KPIC y criterio de positividad	Estándar de referencia y controles	Datos primarios de desempeño	Sensibilidad, especificidad y exactitud	Límite de detección y otros resultados analíticos
(25)	picroindigocarmine durante 15s. Lectura a 400x. Positivo: espermatozoides completos o cabezas y colas separadas; escala de densidad de +1 a +4.	de Barberio. Un control negativo y tres réplicas por tejido y tiempo.	mancha: algodón r = −0,94; nailon r = −0,77; mezclilla r = −0,77. La recuperación fue mayor en algodón.	diagnóstica: NR.	7 días en los tres tejidos, con menor proporción de espermatozoides intactos.
Simons & Vintiner (26)	Fijación en acetona durante 90 s; Nuclear Fast Red durante 15 min y picroindigocarmine durante 15 s. El desenlace fue recuperación de ADN y obtención de perfiles STR, no identificación espermática.	H&E, inmunohistoquímica DAB, tinción de Danes modificada y láminas no teñidas. Control interno de amplificación mediante Quantifiler.	KPIC y H&E produjeron la mayor recuperación de ADN por célula, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambas (ANOVA: F = 1,79; p = 0,186). KPIC permitió obtener perfiles STR completos o altamente informativos después de 10 semanas.	Sensibilidad, especificidad y exactitud para identificación espermática: NA.	Límite de detección de KPIC: NE. Para el análisis genético posterior se utilizaron aproximadamente 1,5 ng con Identifiler y 0,1 ng con SGM Plus.
Fejes et al. (11)	Secado al aire y tinción según Hendin et al.; lectura morfológica a 100–400×. Positivo: espermatozoide con morfología y patrón cromático característicos.	H&E, prueba de fosfatasa ácida, inmunoensayo de PSA, RT-qPCR y perfiles STR. Controles pareados no tratados con ozono.	La exposición a ozono no produjo cambios visibles en la morfología ni en la calidad de KPIC en las diluciones examinadas. Se recuperaron todos los alelos STR; las pruebas de PSA y fosfatasa ácida perdieron capacidad de detección en diluciones altas.	Se detectó espermatozoides en todas las diluciones con semen examinadas, pero sensibilidad, especificidad o exactitud no se estimó.	Detección microscópica hasta la dilución 1:1000 después del tratamiento con ozono.
Hendin et al. (27)	Fijación con etanol durante 15 min; Nuclear Fast Red durante 15 min y picroindigocarmine durante 15 s. Positivo: espermátidas redondas o espermatozoides completos con cabeza roja y cola verde.	Tinción de Wright y biopsia testicular. Control blanco de Cytospin y 10 controles CBAVD.	Se identificaron células germinales maduras en 15/20 pacientes (75 %) y espermatozoides completamente formados en 9/20 (45 %). Ninguno de los 10 controles CBAVD fue positivo.	Sensibilidad comunicada para detección de células germinales maduras: 75 %. Especificidad: 100 % en 10 controles. Exactitud global: NR.	Detección de espermatozoides y espermátidas raros o aislados en muestras inicialmente consideradas azoospérmicas.

Autor(es)	Aplicación de KPIC y criterio de positividad	Estándar de referencia y controles	Datos primarios de desempeño	Sensibilidad, especificidad y exactitud	Límite de detección y otros resultados analíticos
Sharma et al. (28)	Fijación con etanol durante 15 min; Nuclear Fast Red durante 15 min y picroindigocarmine durante 30 s. Lectura a 1000×. Positivo: cabeza roja o rosa y cola verde.	Examen en fresco y pellet conforme a OMS; mTESE como resultado clínico complementario. Control de calidad de donante sano y blanco de solución salina.	NF-PIC detectó espermatozoides en 60/251 pacientes (23,9 %) previamente clasificados como azoospérmicos. Entre 13 pacientes NF-PIC positivos sometidos a mTESE, se recuperaron espermatozoides en 9 (69,2 %).	Sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica: NR.	Detección de espermatozoides aislados concentrados en un área de 32 mm². No se informó concentración mínima.
Leubitz & Savage (14)	Frotis secado al aire y tinción PIC/NF. Positivo: cabeza roja y cola verde a 400×. Se examinó 10 campos y, si eran negativos, otros 10 antes de emitir el resultado.	Hemocitómetro de Neubauer y examen en fresco. Tres muestras azoospérmicas como controles negativos. Evaluación ciega de diluciones.	Se observó espermatozoides a 0,10 y 0,15 × 10^6/mL. KPIC detectó espermatozoides en 5/6 muestras oligospérmicas; las tres muestras azoospérmicas fueron correctamente negativas.	Sensibilidad diagnóstica convencional: NR; detección en muestras oligospérmicas: 5/6 (83,3 %). Especificidad observada: 3/3 (100 %), con tamaño muestral limitado.	Umbral empírico aproximado: 0,12 × 10^6 espermatozoides/mL; a 0,09 × 10^6/mL no se observaron espermatozoides en 20 campos.
Humanes et al. (20)	KPIC según protocolo forense estandarizado; adquisición de imágenes a 20×. Detección con YOLOv10-L y confirmación por el perito. Clasificación: ausente, raro (1–10) u ocasional (>10).	Examen microscópico manual por tres peritos independientes. Parches con y sin espermatozoides para desarrollo/evaluación del algoritmo.	Modelo: *precision* 94 %, *recall* 72,3 % y mAP50 = 0,842. En 30 casos, la lectura asistida detectó 4,50 ± 1,60 espermatozoides/muestra frente a 3,14 ± 1,44 manualmente ($p < 0,001$; $r = 0,78$), incremento aproximado del 43 %.	Sensibilidad/*recall*: 72,3 % a nivel de objeto. Especificidad: NR. Exactitud global: NR;	Detección de espermatozoides aislados en la lámina; no se estableció una concentración mínima.
Mitchell (29)	Secado al aire; Kernechtrot durante 15 min y picroindigocarmine durante 15 s. Algoritmo basado en color, contraste acrosómico y tamaño, seguido de confirmación pericial.	Microscopía manual de campo claro y contraste de fase. Muestras negativas y muestras de donantes como controles.	El sistema encontró 106,28 % ± 115,37 % más espermatozoides que los analistas en los ensayos de sensibilidad. En casos reales detectó 214,10 % más que la lectura manual de campo claro y 1770,68 % más que el contraste de fase. En 92,73 % de las láminas encontró un número igual o mayor	Sensibilidad formal: NR; no se registraron falsos negativos en la clasificación de láminas. Especificidad reportada: 100 %, sin denominador completo. Exactitud global: NR.	Detección en diluciones de hasta 1:100 000 y en muestras postcoitales de 90 h o más.

Autor(es)	Aplicación de KPIC y criterio de positividad	Estándar de referencia y controles	Datos primarios de desempeño	Sensibilidad, especificidad y exactitud	Límite de detección y otros resultados analíticos
			que el analista.		
Alger et al. (30)	Fijación por calor; Nuclear Fast Red durante 15 min y picroindigocarmine durante menos de 10 s. Clasificación por tamaño, forma y color, seguida de revisión de la galería por el analista.	Comparación de plataformas automatizadas y tinciones de campo claro y fluorescentes. Láminas de control estándar para calibración.	Se registraron tres falsos negativos en 376 láminas, asociados con exceso de detritos o tinción deficiente; proporción global comunicada <1 % (aproximadamente 0,8 %).	Sensibilidad formal: NR, porque no se informó el número total de láminas verdaderamente positivas. Especificidad y exactitud: NR.	Capacidad de localizar un espermatozoide aislado en una lámina completa.
Grosjean & Castella (31)	KPIC convencional, aproximadamente 20 min; positividad basada en observación morfológica.	Comparación directa con Sperm Hy-Liter; muestras puras, mezclas y blancos.	KPIC no fue afectada por la autofluorescencia del sustrato, pero presentó dificultades en agregados celulares densos. Hy-Liter mostró desprendimiento celular, tinción heterogénea, efecto de anillo y variación asociada con DTT.	Sensibilidad, especificidad y exactitud de KPIC: NR. La comparación fue predominantemente cualitativa.	Se evaluaron diluciones hasta 1:1000, pero no se determinó un límite de detección para KPIC.

Nota. KPIC: Kernechtrot-picroindigocarmín; H&E: hematoxilina-eosina; NR: no reportado; NE: no evaluado; NA: no aplicable; HPF: campo de gran aumento; CBAVD: ausencia bilateral congénita de los conductos diferentes; mTESE: extracción microquirúrgica de espermatozoides testiculares; CV: coeficiente de variación; mAP50: precisión media promedio con umbral de intersección sobre unión de 0,50.

De acuerdo con los hallazgos, KPIC es una herramienta que logró detectar espermatozoides en muestras diluidas, envejecidas, contaminadas y previamente clasificadas como azoospérmicas, con incrementos de detección del 14,2 % y 23,9 % en dos estudios clínicos. El umbral cuantitativo más claramente definido fue de aproximadamente 0,12 × 10^6 espermatozoides/mL, aunque otros trabajos informaron detección en diluciones de hasta 1:1000 o 1:100 000 y de células aisladas en una lámina completa.

Se demostró que los sistemas automatizados no solo incrementaron el recuento, sino también la concordancia entre examinadores. El modelo más reciente alcanzó un recall del 72,3 %, una precision del 94 %, una mAP50 de 0,842 y un κ de Fleiss de 0,858. Sin embargo, solo unos pocos estudios proporcionaron denominadores y estándares de referencia suficientes para de manera formal estimar sensibilidad, especificidad y exactitud, lo que limita la comparación cuantitativa directa del desempeño de KPIC.

La Tabla 5 resume la influencia de los factores preanalíticos y ambientales sobre los resultados

de la tinción KPIC en los estudios incluidos. Se describen el tiempo transcurrido desde la deposición, recolección o preparación de las muestras; los procedimientos de toma, recuperación y concentración celular; las condiciones de almacenamiento y transporte; la composición y el sustrato; y las exposiciones ambientales o procesos de degradación evaluados.

Tabla 5. Influencia de los factores preanalíticos y ambientales en los resultados de la tinción KPIC

Autor(es)	Tiempo desde la deposición, recolección o preparación	Toma, recuperación y preparación de la muestra	Almacenamiento y transporte	Composición de la muestra y sustrato	Exposición ambiental o degradación	Efecto observado sobre KPIC
Athira et al. (23)	Evaluación a las 24 h, 1 semana, 2 semanas y 1 mes después de la deposición.	Extracción de la mancha en agua acidulada durante 2 h; centrifugación a 3000 rpm durante 20 min y preparación del frotis con el pellet celular.	Semen original conservado a 4 °C. Manchas dobladas y almacenadas a temperatura ambiente simulada durante un mes.	Semen de un donante depositado en algodón blanco, con detergentes, lubricantes de preservativos, tierra o saliva.	Exposición química y biológica, junto con envejecimiento durante 30 días.	La contaminación no impidió la detección, aunque la densidad espermática disminuyó con el tiempo. Se observaron células hasta los 30 días; DAPI mostró mayor constancia ante contaminación intensa.
Monteiro et al. (24)	Procesamiento después de la licuefacción de muestras obtenidas tras 48–72 h de abstinencia.	Recolección por masturbación; centrifugación inicial a 3000g durante 15 min, evaluación del pellet y, si era negativo, microcentrifugación a 2000g durante 15 min antes de extender el sedimento completo.	Procesamiento inmediato en un laboratorio andrológico; transporte no descrito.	Sedimento de semen de pacientes inicialmente clasificados como azoospérmicos, extendido sobre portaobjetos.	No se evaluó exposición ambiental; las muestras procedían de pacientes con alteraciones espermatogénicas.	La concentración del sedimento permitió detectar espermatozoides en 21/148 muestras (14,2 %) previamente negativas.
Allery et al. (15)	Intervalos postcoitales <12 h, 12–72 h y >72 h.	Hisopado cervicovaginal realizado con espéculo; preparación directa de tres frotis paralelos por muestra.	Condiciones y duración del almacenamiento no reportadas.	Muestras cervicovaginales sobre portaobjetos de vidrio.	Degradación en la cavidad vaginal asociada con el tiempo postcoital y la carga espermática inicial. No se realizaron	La detección disminuyó con el tiempo. KPIC identificó 9,1 espermatozoides/campo frente a 2,6 con H&E entre 12–72 h; ninguna tinción detectó células

Autor(es)	Tiempo desde la deposición, recolección o preparación	Toma, recuperación y preparación de la muestra	Almacenamiento y transporte	Composición de la muestra y sustrato	Exposición ambiental o degradación	Efecto observado sobre KPIC
					duchas vaginales.	después de 72 h.
Panicker et al. (25)	Envejecimiento durante 1, 3, 5 y 7 días.	Corte de 1 × 1 cm del centro de la tela; inmersión en 500 µL de agua destilada, agitación durante 2 min, reposo nocturno y preparación del frotis con 5 µL del extracto.	Incubación controlada a 25 °C durante un máximo de 7 días.	Semen depositado en algodón, nailon y mezclilla.	Secado y envejecimiento; absorción de la muestra en fibras naturales, sintéticas y teñidas.	La densidad espermática disminuyó con la antigüedad de la mancha (r = −0,77 a −0,94). KPIC mantuvo resultados positivos hasta los 7 días, con mayor recuperación en algodón.
Simons & Vintiner (26)	Láminas evaluadas después de 0, 2, 4 y 10 semanas de almacenamiento.	Frotis directo de células vaginales; fijación en acetona y, para la recuperación de ADN, retirada del cubreobjetos, raspado y extracción con proteinasa K y fenol-cloroformo.	Láminas montadas con DPX y almacenadas a temperatura ambiente durante un máximo de 10 semanas.	Células epiteliales vaginales sobre portaobjetos convencionales o recubiertos con poli-L-lisina.	Almacenamiento prolongado y exposición a reactivos de tinción.	KPIC y H&E presentaron mayor recuperación de ADN, sin interacción significativa entre tinción y almacenamiento (p = 0,42). Se obtuvieron perfiles STR informativos tras 10 semanas; no se evaluó el efecto sobre la detección espermática.
Fejes et al. (11)	Secado de las muestras durante al menos 3 h antes del tratamiento.	Se depositaron 10 µL de muestra sobre portaobjetos; las preparaciones se asignaron a un grupo tratado con ozono y a un grupo control.	Secado a temperatura ambiente y posterior tratamiento en una cámara de ozono; transporte no aplicable.	Semen puro y diluido hasta 1:1000, junto con sangre y saliva, sobre portaobjetos y algodón.	Exposición a ozono, un agente oxidante utilizado para desinfección.	El ozono no alteró visiblemente la morfología ni la tinción KPIC. Se detectaron espermatozoides hasta una dilución 1:1000 y se recuperaron todos los alelos STR.
Hendin et al. (27)	Procesamiento inmediato durante la evaluación clínica; no se	Después de tres frotis húmedos negativos, se prepararon dos frotis largos, dos	Procesamiento rutinario inmediato a temperatura	Semen de pacientes con falla espermatogénica,	No hubo exposición ambiental; la escasez celular se relacionó	La concentración celular permitió identificar células germinales maduras en 15/20 pacientes

Autor(es)	Tiempo desde la deposición, recolección o preparación	Toma, recuperación y preparación de la muestra	Almacenamiento y transporte	Composición de la muestra y sustrato	Exposición ambiental o degradación	Efecto observado sobre KPIC
	informó un intervalo específico desde la eyaculación.	láminas Cytospin a 310g durante 10 min y una lámina en blanco.	ambiente.	concentrado mediante Cytospin sobre portaobjetos.	con alteraciones graves de la espermatogénesis.	(75 %) y espermatozoides completos en 9/20 (45 %).
Sharma et al. (28)	Análisis después de la licuefacción completa y procesamiento inmediato.	Examen en fresco con 6 µL; centrifugación OMS a 3000g durante 15 min; reevaluación del pellet y, si era negativo, concentración mediante Cytospin a 500g durante 10 min en un área de 32 mm².	Procesamiento inmediato a temperatura ambiente; transporte no descrito.	Pellet de semen de pacientes con azoospermia o criptozoospermia, concentrado sobre portaobjetos.	No se evaluaron condiciones ambientales; la dificultad analítica fue la baja concentración espermática asociada con falla espermatogénica.	La concentración mediante Cytospin con NF-PIC permitió detectar espermatozoides en 60/251 pacientes (23,9 %) previamente clasificados como azoospérmicos.
Leubitz & Savage (14)	Muestras frescas procesadas dentro de las 4 h posteriores a la eyaculación.	Recuento en hemocitómetro, dilución seriada con solución salina y preparación de frotis mediante gota directa o hisopo de algodón.	Procesamiento inmediato; no se evaluó almacenamiento prolongado.	Semen fresco, muestras oligospérmicas y azoospérmicas, y diluciones sobre portaobjetos.	Dilución extrema para simular la dispersión del semen en secreciones o lavados.	La detección disminuyó con la concentración espermática. KPIC identificó células a ≈0,12 × 10^6/mL, pero no a 0,09 × 10^6/mL tras examinar 20 campos; detectó 5/6 muestras oligospérmicas.
Humanes et al. (20)	Muestras procedentes de casos forenses cerrados y archivados; antigüedad no especificada.	Extracción con Tris-EDTA, SDS y proteinasa K; incubación a 42 °C durante 30 min, centrifugación a 10 000 rpm durante 5 min, resuspensión del pellet, depósito en lámina y secado al aire.	Conservación conforme al protocolo del laboratorio forense; duración y transporte no reportados.	Extractos de hisopos y prendas de casos de agresión sexual, con carga variable de células epiteliales, moco y detritos.	Degradación y composición heterogénea propias de casos reales archivados.	En muestras de casos reales, la lectura asistida identificó aproximadamente un 43 % más de espermatozoides que la manual; no se cuantificó el efecto individual de las condiciones de conservación y degradación.

Autor(es)	Tiempo desde la deposición, recolección o preparación	Toma, recuperación y preparación de la muestra	Almacenamiento y transporte	Composición de la muestra y sustrato	Exposición ambiental o degradación	Efecto observado sobre KPIC
Mitchell (29)	Muestras postcoitales obtenidas entre 0 y más de 90 h después del coito.	Recuperación del material del hisopo con una pequeña cantidad de agua desionizada y preparación del frotis; secado al aire durante 1 h.	Secado y procesamiento, temperatura ambiente.	Semen puro o diluido; hisopos vaginales, orales, rectales y postcoitales; muestras con lubricantes, jabones o levaduras.	Degradación en la cavidad vaginal, dilución y presencia de contaminantes biológicos o químicos.	El sistema detectó espermatozoides hasta una dilución 1:100 000 y en muestras postcoitales de ≥90 h. Igualó o superó la lectura manual en el 92,73 % de las láminas, sin falsos negativos entre las positivas.
Alger et al. (30)	Láminas de casos activos y archivados; duración del archivo no especificada.	Incubación de recortes o hisopos en aproximadamente 200 µL de HBS durante 30 min a 4 °C, centrifugación y transferencia del pellet a la lámina; secado y fijación por calor.	Conservación conforme a los procedimientos del laboratorio forense.	Extractos de hisopos y recortes de tela con mezclas celulares y abundantes detritos.	Degradación de la tinción durante el archivo y fondos complejos con detritos.	Se registraron 3 falsos negativos en 376 láminas (0,8 %), asociados con detritos o tinción deficiente. El almacenamiento prolongado redujo la intensidad cromática y ocasionalmente exigió reteñido.
Grosjean & Castella (31)	Muestras simuladas y casos reales; tiempo desde la deposición no especificado.	Recuperación de células de FLOQSwabs en Universal Buffer o PBS; preparación sobre láminas y aplicación de KPIC o Sperm Hy-Liter.	Procesamiento según protocolo del laboratorio; duración y transporte no reportados.	Semen diluido entre 1:20 y 1:1000, mezclas biológicas, bacterias, levaduras y muestras sobre sustratos autofluorescentes.	Mezclas celulares densas, microorganismos y autofluorescencia del sustrato.	La autofluorescencia del sustrato no afectó a KPIC, pero los agregados celulares densos dificultaron la identificación. Se evaluaron diluciones hasta 1:1000, sin determinar un límite formal de detección.

Nota. KPIC: Kernechtrot-picroindigocarmine; H&E: hematoxilina-eosina; DAPI: 4’,6-diamidino-2-fenilindol; OMS: Organización Mundial de la Salud; HBS: solución salina tamponada con HEPES; NR: no reportado; NE: no evaluado.

Los resultados mostraron que el tiempo, la concentración celular, el sustrato y la complejidad de la muestra modificaron la capacidad de detección con KPIC. La microcentrifugación y Cytospin incrementaron la detección en un 14,2 % y 23,9 %, respectivamente, en muestras previamente clasificadas como azoospérmicas. La antigüedad redujo la densidad espermática

de manera progresiva: no se detectaron espermatozoides después de 72 h en muestras cervicovaginales, aunque en tejidos sí se mantuvieron hasta 7 días. A las células que estaban en la materia residual se les pudo ubicar dispersas a los 30 días en el algodón contaminado. Estas diferencias corresponden a matrices y protocolos distintos y no representan límites temporales directamente comparables.

El algodón mostró una recuperación mucho más alta que la de nailon y la mezclilla, mientras que la exposición a ozono no alteró la morfología ni el patrón de tinción hasta una dilución de 1:1000. En muestras forenses complejas, los detritos, los agregados celulares densos, la mala tinción y la pérdida de intensidad durante el almacenamiento por largo tiempo, dificultaron la identificación, en tanto que la autofluorescencia del sustrato no afectó la lectura de KPIC.

KPIC mostró un rendimiento global similar al de H&E, pero fue más fácil de leer y permitió observar un número de espermatozoides más alto por campo. Aparte de esto, mostró una mejor confirmación morfológica que las pruebas presuntivas y tuvo menos interferencia por autofluorescencia que los métodos fluorescentes. En comparación, Sperm Hy-Liter estuvo disponible con un tiempo de preparación menor y un costo estimado entre 40 y 50 veces inferior, aunque su rendimiento fue limitado en el reconocimiento de espermatozoides en agregados celulares densos. DAPI fue más veloz y mantuvo una tasa de detección más constante en algunas muestras muy contaminadas, mientras que KPIC requirió mayor tiempo y una búsqueda microscópica dependiente del observador.

La Tabla 6 presenta las ventajas y desventajas de la tinción KPIC frente a las principales técnicas empleadas para la identificación y el análisis de espermatozoides.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de KPIC frente a otras técnicas de identificación y análisis de espermatozoides.

Técnica comparadora	Clase de técnica	Principales hallazgos comparativos	Ventajas de KPIC	Desventajas de KPIC	Aspectos operativos	Autor(es)
Hematoxilina-eosina (H&E) y fucsina alcalina	Microscópica/ citológica	Detección similar a H&E (35,1 % frente a 34,7 %), pero mayor número de espermatozoides por campo (8,3 frente a 4,6 y 4,2, respectivamente; p = 0,023 y p = 0,017). Recuperación de ADN comparable a H&E.	Mayor contraste y diferenciación morfológica; compatible con perfiles STR.	No evita la pérdida de espermatozoides en muestras cervicovaginales después de 72 h; requiere manipulación segura del ácido pícrico.	Microscopio óptico convencional; preparación aproximada de 15–20 min, además de fijación y montaje. Las láminas pueden conservarse para revisión posterior.	(11,15,26)
Tinción de Wright	Microscópic	KPIC identifica	Identificación	Posible	Requiere	(27)

Técnica comparadora	Clase de técnica	Principales hallazgos comparativos	Ventajas de KPIC	Desventajas de KPIC	Aspectos operativos	Autor(es)
	a/ citológica	células germinales maduras, pero Wright permite diferenciar estructuras redondas morfológicamente ambiguas.	de espermatozoides completos y células germinales escasas.	confusión entre espermátidas redondas y leucocitos; requiere tinción complementaria.	preparación de láminas adicionales y lectura microscópica complementaria, lo que incrementa el tiempo y el consumo de muestra.	
Examen en fresco, microscopía de contraste de fase y procedimientos convencionales de la OMS	Microscópica	Tras la concentración, KPIC detectó espermatozoides en el 14,2 % y 23,9 % de muestras previamente clasificadas como azoospérmicas. Detección aproximada de $0{,}12 \times 10^6$ espermatozoides/mL en diluciones seriadas.	Mayor contraste, detección de células escasas y conservación de preparaciones permanentes.	Rendimiento dependiente de concentración previa, extensión de la búsqueda y experiencia del observador; posible consumo del sedimento.	Microscopio óptico de 400–1000× y, según el protocolo, microcentrífuga o Cytospin. En muestras muy diluidas se requieren al menos 20 campos de gran aumento o una búsqueda extendida.	(14,24,28,29)
Pruebas de Florence, Barberio, luminiscencia UV y evaluación mediante VSC	Presuntiva/ microquímica	Las pruebas presuntivas permiten localizar manchas, pero pueden presentar interferencias. KPIC aporta confirmación morfológica mediante visualización directa de espermatozoides.	Mayor especificidad morfológica frente a señales presuntivas inespecíficas.	Mayor tiempo de procesamiento (15–25 min de tinción, más lectura); rendimiento condicionado por la degradación celular.	Las pruebas preliminares son rápidas, mientras que KPIC requiere aproximadamente 15–25 min de tinción más la lectura. El VSC necesita instrumentación específica.	(23,25)
Fosfatasa ácida y PSA	Presuntiva e inmunológica	Tras exposición a ozono, KPIC permitió identificar	Identificación morfológica pese al tratamiento	Requiere células reconocibles; no se dispone	Microscopio óptico y protocolo de tinción	(11)

Técnica comparadora	Clase de técnica	Principales hallazgos comparativos	Ventajas de KPIC	Desventajas de KPIC	Aspectos operativos	Autor(es)
		espermatozoides hasta una dilución 1:1000, mientras que las pruebas basadas en marcadores seminales perdieron capacidad de detección en diluciones altas.	oxidativo y menor dependencia de marcadores solubles.	de estimaciones comparativas formales de sensibilidad y especificidad.	convencional. Las pruebas inmunológicas o enzimáticas son más sencillas para el cribado, pero no proporcionan confirmación morfológica.	
DAPI, SYBR Green y naranja de acridina	Fluorescente	DAPI presentó mayor rapidez y detección más constante en algunas muestras contaminadas. Los métodos fluorescentes mostraron interferencias de fondo o tinción inespecífica, mientras que KPIC conservó el detalle morfológico.	Microscopía convencional, menor costo de reactivos y ausencia de interferencia por autofluorescencia del sustrato.	Procesamiento más lento; menor rendimiento visual con abundantes detritos o degradación severa.	KPIC utiliza un microscopio óptico convencional. Las técnicas fluorescentes requieren microscopio o sistema espectral, filtros, reactivos específicos y control de fondo; DAPI implica además consideraciones de toxicidad.	(23,30,31)
Sperm Hy-Liter	Inmunológica/ fluorescente	Hy-Liter presentó fluorescencia en agregados celulares, desprendimiento celular y variabilidad de tinción. KPIC evitó interferencias por autofluorescencia, con menor tiempo y costo de preparación (0,5 € y 20 min frente a 20–25 € y 60 min).	Menor costo y complejidad operativa; identificación morfológica en campo claro.	Menor capacidad para localizar espermatozoides en agregados densos; carece de selectividad inmunológica.	KPIC: aproximadamente 0,5 € y 20 min de preparación por muestra. Hy-Liter: aproximadamente 20–25 €, 60 min de preparación y microscopio de fluorescencia. El costo estimado de Hy-Liter fue 40–50 veces	(30,31)

Técnica comparadora	Clase de técnica	Principales hallazgos comparativos	Ventajas de KPIC	Desventajas de KPIC	Aspectos operativos	Autor(es)
					mayor.	
Inmunohistoquímica DAB y tinción de Danes modificada	Inmunológica/ histoquímica	KPIC permitió recuperar más ADN por célula y no presentó inhibición de PCR, a diferencia de DAB y Danes. Conservó ADN utilizable al menos 10 semanas en las condiciones estudiadas.	Mejor compatibilidad con extracción de ADN, PCR y perfiles STR; permite reexaminar preparaciones.	Recuperación celular mediante desmontaje y raspado; precauciones por el uso de ácido pícrico.	Para el procesamiento posterior se requieren procedimientos de extracción, PCR y electroforesis capilar. KPIC conserva material genético utilizable hasta por lo menos 10 semanas en las condiciones evaluadas.	(26)

Nota. KPIC: Kernechtrot-picroindigocarmine; H&E: hematoxilina-eosina; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; PSA: antígeno prostático específico; VSC: comparador espectral de video; DAB: 3,3'-diaminobencidina; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa; STR: repeticiones cortas en tándem; DTT: ditiotreitol;

DISCUSIÓN

Los resultados han demostrado que la tinción KPIC sigue siendo una metodología importante para la identificación de espermatozoides en muestras forenses y en muestras experimentales. Su principal fortaleza es el contraste diferencial entre la cabeza roja o rosada y la cola verde, que facilita reconocer células escasas, fragmentadas o inmersas en fondos con células epiteliales. La detección de espermatozoides aislados en muestras inicialmente clasificadas como azoospérmicas, diluciones elevadas y manchas envejecidas respalda su sensibilidad práctica (14,24,27,28).

La evidencia cuantitativa no es uniforme. Leubitz y Savage (14) situaron el límite de detección alrededor de 0,10–0,15 × 10^6 espermatozoides/mL, mientras que Monteiro et al. (24) y Sharma et al. (28) reclasificaron como criptozoospérmicas el 14,2 % y el 23,9 % de muestras consideradas azoospérmicas mediante procedimientos convencionales. Allery et al. (15) encontraron una tasa global similar entre KPIC y hematoxilina-eosina, aunque KPIC permitió visualizar más espermatozoides por campo. Estos resultados no corresponden a una sensibilidad clínica o forense generalizable, pues son de diferentes poblaciones, preparaciones y referencias.

Asimismo, la ausencia de espermatozoides después de 72 horas en muestras cervicovaginales

(15) debe interpretarse considerando los procesos de degradación y eliminación propios del medio intravaginal. La actividad ezimática y la respuesta inmunitaria, incluida la fagocitosis de espermatozoides por leucocitos, constituyen mecanismos que pueden contribuir a la reducción progresiva de las células disponibles para su identificación microscópica (32,33). Por el contrario, la detección de hasta 7 días en telas y hasta 30 días en manchas contaminadas (23,25), corresponde a la persistencia de estructuras espermáticas en soportes externos, donde no actúan los mecanismos de eliminación del tracto genital y la desecación puede favorecer su conservación durante semanas.

Por tanto, los resultados son compatibles y reflejan la influencia de la matriz y de las condiciones de conservación sobre la detectabilidad espermática. El intervalo de 72 horas observado no debe extrapolarse a manchas secas ni interpretarse como un límite universal para muestras intravaginales. Por consiguiente, el rendimiento de la tinción Christmas Tree debe evaluarse teniendo en cuenta el lugar de recogida, el tiempo transcurrido y la eficiencia en la recuperación celular. El algodón permitió una mejor recuperación que la tela vaquera, mientras que la presencia de tierra, hongos, lubricantes y residuos dificultó la interpretación. En cambio, el ozono no alteró la morfología ni la capacidad de detección hasta una dilución de 1:1000. (11).

Los hallazgos coinciden con revisiones que mantienen la microscopía como referencia para demostrar espermatozoides, pero advierten su dependencia del observador y su incapacidad ante azoospermia o ausencia celular (34,35). Las innovaciones recientes buscan resolver esos límites sin demostrar todavía una sustitución universal de KPIC. Una red convolucional aplicada a imágenes microscópicas alcanzó una exactitud del 95%(36), en consonancia con el aumento de detección y concordancia interobservador observado mediante KPICS, MetaSystems y Spitz (20,29,30).

No obstante, los candidatos falsos positivos y los fallos en frotis densos o mal teñidos mantienen necesaria la verificación humana. En paralelo, un sistema microfluídico con análisis de imágenes procesó muestras simuladas en menos de 15 minutos y superó el 95 % de exactitud frente al recuento manual (37), mientras que un ensayo 3-plex MSRE-PCR produjo resultados concordantes en seis laboratorios (38). La nueva tinción fluorescente CPM/AO también mostró capacidad para detectar espermatozoides en muestras envejecidas (39), pero requiere validación comparativa en casuística real.

En la práctica, KPIC resulta adecuado para laboratorios con recursos limitados por su bajo costo, disponibilidad y compatibilidad con microscopía de campo claro. La comparación económica disponible estima un costo de reactivos por muestra de aproximadamente 40 o 50 veces menor que Sperm Hy-Liter. Esto, sumado a un procedimiento más sencillo y a la ausencia de interferencia por autoflorescencia, favorece su implementación cuando el presupuesto y el equipamiento son limitados. Las técnicas fluorescentes o DAPI pueden facilitar el trabajo incluso en muestras contaminadas (23,31).

Por otra parte, Simons y Vintiner (26) lograron recuperar los perfiles STR informativos de las

muestras KPIC que fueron almacenadas, aun cuando usaron células epiteliales vaginales como modelo. Su implementación debe incorporar controles positivos, negativos y de contaminación; criterios mínimos para la toma de muestras mediante frotis y para determinar la positividad; capacitación y pruebas de competencia; documentación fotográfica; y protocolos diferenciados según el sustrato, la antigüedad y la carga de residuos. Un resultado negativo debe interpretarse junto con las pruebas de fosfatasa ácida, PSA/P30 o semenogelina, los antecedentes de la muestra y los resultados genéticos.

El número limitado de investigaciones, la heterogeneidad que presentan en su diseño, así como la combinación de muestras clínicas, simuladas y forenses, constituyen las limitaciones de esta revisión. Se observó principalmente tamaños pequeños, investigaciones de un solo centro o donante y resultados cualitativos. Además, rara vez se calculan la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la reproducibilidad frente a un estándar independiente. Las discrepancias en cuanto a la extracción, la fijación, la formulación, el aumento microscópico y la definición de positividad impidieron realizar un metaanálisis. La inclusión de estudios técnicos y antiguos amplió la cobertura operativa, pero a la vez aumentó la variabilidad metodológica y el riesgo de sesgo de publicación.

Los futuros estudios deben llevar a cabo verificaciones prospectivas, multicéntricas y ciegas, utilizando muestras reales y simuladas estandarizadas, incluir condiciones ambientales y sustratos locales, y reportar matrices completas de exactitud, límites de detección e incertidumbre inter-observador. Asimismo, se debe evaluar el consumo de muestra, la recuperación posterior de ADN, el costo por caso y el tiempo activo de procesamiento. Aunque la automatización es prometedora, requiere principalmente conjuntos externos representativos, criterios auditables y supervisión pericial.

CONCLUSIONES

La evidencia disponible corrobora la utilidad analítica de KPIC para confirmar microscópicamente la presencia de espermatozoides, aun cuando estos son escasos, se encuentran diluidos o presentan pérdida parcial de su estructura. El contraste diferencial de sus componentes facilita la identificación morfológica frente a células epiteliales y detritos. pesar de eso, el diseño heterogéneo y la falta de datos sobre sensibilidad, especificidad y exactitud, impiden la posibilidad de definir una técnica universal para el diagnóstico. Así, Christmas Tree constituye una técnica muy certera para identificar células espermáticas cuando están presentes.

El rendimiento de la técnica KPIC se ve influido considerablemente por variables preanalíticas. El paso del tiempo reduce progresivamente el número de espermatozoides recuperables y favorece la fragmentación celular, si bien la velocidad de degradación difiere entre las muestras cervicovaginales y las manchas secas. Además, el tipo de sustrato, la eficiencia del procedimiento de recuperación y la presencia de suciedad, microorganismos, lubricantes o detritos pueden reducir la visibilidad y dificultar la interpretación. Los datos relativos al

almacenamiento y transporte carecían de una base científica suficiente para establecer límites generales de tiempo o condiciones ambientales.

En comparación con otras técnicas, KPIC ofrece un equilibrio favorable entre capacidad de confirmación morfológica, coste, disponibilidad equipo requerido, además de ser compatible con análisis genéticos posteriores. La tinción con hematoxilina-eosina tuvo un rendimiento global que fue similar, aunque de manera general se observó un menor contraste. Las técnicas fluorescentes, moleculares y automatizadas no solo pueden aumentar la detección de las células escasas, sino que también, en consecuencia, reducir la búsqueda manual, o, incluso, garantizar la identificación de direcciones seminales en la ausencia de espermatozoides. Sin embargo, su aplicación va acompañada de una mayor inversión, a la vez de la necesidad de una infraestructura especializada, y aun así requieren verificación humana o una validación adicional sobre muestras reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreira N, Faria D, Fernandes J, Lourenço H, Santos N, Pinto CA, et al. Biotechnology Applied to Forensic Sciences. Applied Sciences. enero de 2026;16(12):5899. doi:10.3390/app16125899
2. Kayser M. Forensic genetics in the omics era. Nat Rev Genet. febrero de 2026;27(2):170–86. doi:10.1038/s41576-025-00896-1
3. Basset P, Blandin P, Grini A, Delemont S, Samie L, Castella V. A simplified protocol for the detection of blood, saliva, and semen from a single biological trace using immunochromatographic tests. Forensic Sci Med Pathol. el 1 de junio de 2022;18(2):141–8. doi:10.1007/s12024-021-00453-2
4. Samie L, Champod C, Delémont S, Basset P, Hicks T, Castella V. Use of Bayesian Networks for the investigation of the nature of biological material in casework. Forensic Science International. el 1 de febrero de 2022;331:111174. doi:10.1016/j.forsciint.2022.111174
5. Schulte J, Egger S, Kron S, Scheurer E, Schulz I. Evaluating novel and conventional cell-separation techniques for sexual assault investigations. Journal of Forensic Sciences. 2025;70(5):1704–20. doi:10.1111/1556-4029.70131
6. Davidovics R, Saw YL, Brown CO, Prinz M, McKiernan HE, Danielson PB, et al. High-throughput seminal fluid identification by automated immunoaffinity mass spectrometry. J Forensic Sci. mayo de 2022;67(3):1184–90. doi:10.1111/1556-4029.14975 PubMed PMID: 35023573.
7. Topping DC, Tran T, Hymus CM, Mountford NS, Liew YC, Egan SE, et al. Automated microscopy in forensic biology: Validating the use of deep neural networks for the detection of human spermatozoa in Christmas Tree stained slides. Science & Justice. el 1 de enero de 2026;66(1):101370. doi:10.1016/j.scijus.2025.101370
8. Tian H, Huang S, Bai P, Xiao X, Peng D, Zhao H, et al. The effect of infertile semen on the mRNA-based body fluid identification. ELECTROPHORESIS. 2021;42(16):1614–22. doi:10.1002/elps.202000238
9. Westring CG, Wiuf M, Nielsen SJ, Fogleman JC, Old JB, Lenz C, et al. SPERM HY-LITER™ for

the identification of spermatozoa from sexual assault evidence. Forensic Science International: Genetics. el 1 de septiembre de 2014;12:161–7. doi:10.1016/j.fsigen.2014.06.003 PubMed PMID: 24997321.

10. Medina-Paz F, Kuba B, Kryvorutsky E, Roca G, Zapico SC. Assessment of Blood and Semen Detection and DNA Collection from Swabs up to Three Months after Deposition on Five Different Cloth Materials. International Journal of Molecular Sciences. enero de 2024;25(6):3522. doi:10.3390/ijms25063522
11. Fejes V, Simon G, Makszin L, Sipos K, Poor VS. Evaluation of the effect of ozone disinfection on forensic identification of blood, saliva, and semen stains. Science & Justice. el 1 de marzo de 2024;64(2):151–8. doi:10.1016/j.scijus.2023.12.005
12. Nolan A, Speers SJ, Murakami J, Chapman B. A pilot study: The effects of repeat washing and fabric type on the detection of seminal fluid and spermatozoa. Forensic Science International. el 1 de agosto de 2018;289:51–6. doi:10.1016/j.forsciint.2018.05.021
13. Nogueira TLS, Alem L, Santos OCL, Gonçalves ABR, Dias AS, Silva DA. Human semen stain analysis in casework sample by HRM-qPCR. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. el 1 de diciembre de 2022;8:191–2. doi:10.1016/j.fsigss.2022.10.031
14. Leubitz SS, Savage RA. Sensitivity of Picroindigocarmine /Nuclear Fast Red (PIC/NF) Stain for Detection of Spermatozoa: A Serial Dilution Study of Human Ejaculate. Am J Clin Pathol. el 1 de enero de 1984;81(1):90–3. doi:10.1093/ajcp/81.1.90
15. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological Detection of Spermatozoa: Comparison of Three Staining Methods. J Forensic Sci. el 1 de marzo de 2001;46(2):349–51. doi:10.1520/JFS14970J
16. Schellhammer SK, Hudson BC, Cox JO, Dawson Green T. Alternative direct-to-amplification sperm cell lysis techniques for sexual assault sample processing. Journal of Forensic Sciences. 2022;67(4):1668–78. doi:10.1111/1556-4029.15027
17. Hymus CM, Egan SE, Tay JW. Development of a Simple Cell Harvesting Method to Maximise DNA Recovery from Historic Microscope Slides for Sexual Assault Investigations. Forensic Sciences. diciembre de 2022;2(4):795–807. doi:10.3390/forensicsci2040057
18. Stern A. Sperm cytology: Kernechtrot–picroindigocarmine stain and dog semen. Journal of Veterinary Forensic Sciences. 2020;1(1):23–5. doi:10.32473/jvfs.v1i1.128311
19. Saeed A, Rasool N, Basel ME. Detection of Seminal Material on Hand-Washed Textile Evidence. BioScientific Review. el 14 de marzo de 2025;7(2):12–20. doi:10.32350/bsr.72.02
20. Humanes AC, Calil ALA, Wawruk HD, Carneiro LD, Silveira KB, Yen WC, et al. Spitz: a YOLO-based deep learning system for automated spermatozoa detection in forensic genetic analysis. Int J Legal Med. el 15 de septiembre de 2026. doi:10.1007/s00414-026-04013-7
21. Altmeyer L, Baumer K, Hall D. Differentiation of five forensically relevant body fluids using a small set of microRNA markers. ELECTROPHORESIS. 2024;45(19–20):1785–95. doi:10.1002/elps.202400089
22. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ. el 29 de marzo de 2021;372:n71. doi:10.1136/bmj.n71 PubMed PMID: 33782057.
23. Athira P, Anjana C, Sona A, Prabha S, Prasad M. ADVANCING SPERM CELL DETECTION:

REDUCING ANALYSIS TIME WITH DAPI STAINING IN CONTAMINATED ENVIRONMENTS. RJLM. 2025;33(3):251–5. doi:10.4323/rjlm.2025.251

24. Monteiro RAC, Pariz JR, Pieri P de C, Hallak J. An easy, reproducible and cost-effective method for andrologists to improve the laboratory diagnosis of non-obstructive azoospermia: a novel microcentrifugation technique. Int Braz J Urol. 2016;42(1):132–8. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0090 PubMed PMID: 27136479; PubMed Central PMCID: PMC4811238.
25. Panicker L, D'Silva F, Surve S. Effect of Ageing of Seminal Stains on Their Detection on Fabrics In Criminal Investigations. Arab Journal of Forensic Sciences & Forensic Medicine. el 14 de diciembre de 2022;4(2):89–102. Located at: We confirm that we do not have any conflict of interest related to publishing the scientific paper. doi:10.26735/NHYE4338
26. Simons JL, Vintiner SK. Effects of Histological Staining on the Analysis of Human DNA from Archived Slides. Journal of Forensic Sciences. 2011;56(s1):S223–8. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01595.x
27. Hendin BN, Patel B, Levin HS, Thomas AJ, Agarwal A. Identification of Spermatozoa and Round Spermatids in the Ejaculates of Men with Spermatogenic Failure. Urology. el 1 de mayo de 1998;51(5):816–9. doi:10.1016/S0090-4295(98)00007-7
28. Sharma RK, Gupta S, Agarwal A, Finelli R, Kuroda S, Saleh R, et al. Role of Cytocentrifugation Combined with Nuclear Fast Picroindigocarmine Staining in Detecting Cryptozoospermia in Men Diagnosed with Azoospermia. World J Mens Health. octubre de 2022;40(4):627–35. doi:10.5534/wjmh.210210 PubMed PMID: 35118836; PubMed Central PMCID: PMC9482851.
29. Mitchell A. Validation study of KPICS SpermFinder™ by NicheVision Forensics, LLC for the identification of human spermatozoa. J Forensic Sci. julio de 2012;57(4):1042–50. doi:10.1111/j.1556-4029.2012.02081.x PubMed PMID: 22372428.
30. Alger P, Conti T, Buel E. Development of an Automated System to Detect Spermatozoa on Laboratory Slides to Increase Productivity in the Analysis of Sexual Assault Cases. US Department of Justice [Internet]. 2011. Disponible en: https://www.ojp.gov/pdffiles1/nij/grants/236473.pdf
31. Grosjean F, Castella V. Test of the Hy-liter system for the identification of spermatozoa in sexual assault cases [Internet]. el 9 de septiembre de 2025 [citado el 1 de octubre de 2026];411–6. Disponible en: https://iris.unil.ch/handle/iris/281967
32. Iswara RAFW, Gizela BA, Rohmah IN, Dhanardhono T. Association between menstruation and spermatozoa persistence in sexual assault victims: a medicolegal case–control study in Southeast Sulawesi, Indonesia. Legal Medicine. el 1 de mayo de 2026;83:102856. doi:10.1016/j.legalmed.2026.102856
33. Oren-Benaroya R, Kipnis J, Eisenbach M. Phagocytosis of human post-capacitated spermatozoa by macrophages. Hum Reprod. noviembre de 2007;22(11):2947–55. doi:10.1093/humrep/dem273 PubMed PMID: 17766922.
34. Gamblin AP, Morgan-Smith RK. The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. WIREs Forensic Science. 2020;2(3):e1363. doi:10.1002/wfs2.1363
35. Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current Methods for Body Fluid Identification Related to

Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid. Diagnostics. septiembre de 2020;10(9):693. doi:10.3390/diagnostics10090693

36. Golomingi R, Haas C, Dobay A, Kottner S, Ebert L. Sperm hunting on optical microscope slides for forensic analysis with deep convolutional networks – a feasibility study. Forensic Science International: Genetics. el 1 de enero de 2022;56. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102602 PubMed PMID: 34700216.
37. Deshmukh S, Inci F, Karaaslan MG, Ogut MG, Duncan D, Klevan L, et al. A confirmatory test for sperm in sexual assault samples using a microfluidic-integrated cell phone imaging system. Forensic Sci Int Genet. septiembre de 2020;48:102313. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102313 PubMed PMID: 32570000.
38. Liu KL, Tsai LC, Lin YC, Chang YH, Huang NE, Wu FC, et al. Spermatozoa identification by the 3-plex MSRE-PCR assay: a collaborative exercise. Int J Legal Med. marzo de 2022;136(2):397–404. doi:10.1007/s00414-021-02737-2 PubMed PMID: 34718845.