

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de: Licenciado en  
Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico.

**TITULO DEL PROYECTO:**

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO EN LA  
PRESERVACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN SOPORTES SÓLIDOS.**

**Autores:**

**Jeniffer Paola Sánchez Martínez**

**Luis Eduardo Marquez Once**

**Tutora:**

**MsC. Verónica Cáceres.**

**Riobamba, Ecuador**

**2018**

## REVISION DE TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **"INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO EN LA PRESERVACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN SOPORTES SÓLIDOS"**, presentado por Sánchez Martínez Jeniffer Paola , y dirigida por Msc. Verónica Cáceres Manzano, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Patricia Miño  
**Presidente del Tribunal**



.....  
Firma

Mgs. Mercedes Balladares  
**Miembro del Tribunal**



.....  
Firma

Mgs. Felix Falconi  
**Miembro del Tribunal**



.....  
Firma

## REVISION DE TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **"INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO EN LA PRESERVACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN SOPORTES SÓLIDOS"**, presentado por Marquez Once Luis Eduardo , y dirigida por Msc. Verónica Cáceres Manzano, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Patricia Miño  
**Presidente del Tribunal**



.....  
Firma

Mgs. Mercedes Balladares  
**Miembro del Tribunal**



.....  
Firma

Mgs. Felix Falconi  
**Miembro del Tribunal**



.....  
Firma

## ACEPTACIÓN DEL TUTOR(A)

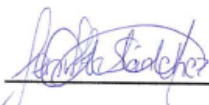
Por la presente, hago constar que he leído el protocolo del proyecto de grado presentado por los señores **JENIFFER PAOLA SÁNCHEZ MARTÍNEZ** y **LUIS EDUARDO MARQUEZ ONCE** para optar al títulos de Licenciados en Laboratorio Clínico e Histopatológicos y que acepto asesorar a los estudiantes en calidad de tutora, a los ejecutores de la investigación durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.



McS. Verónica Cáceres M.

**AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN:**

“LA RESPONSABILIDAD DEL CONTENIDO DE ESTE PROYECTO DE GRADUACIÓN, NOS CORRESPONDE EXCLUSIVAMENTE A: JENIFFER PAOLA SÁNCHEZ MARTÍNEZ, LUIS EDUARDO MARQUEZ ONCE, Y DIRIGIDA POR: MSC. VERÓNICA CÁCERES; Y EL PATRIMONIO INTELECTUAL DE LA MISMA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO.”



Jeniffer Paola Sánchez Martínez  
CI. 060425661-0



Luis Eduardo Marquez Once.  
CI. 060337691-4

## **AGRADECIMIENTO**

Presentamos nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo digna institución formadora de insignes profesionales, en cuyas aulas forjamos con entusiasmo nuestro porvenir, nuestra eterna gratitud a todos nuestros amados docentes quienes con sus capacidades y conocimientos nos han brindado una sólida formación competitiva apoyando nuestro crecimiento personal a nuestra querida Directora de Escuela Patricia Miño y a Nuestra tutora Lic. Verónica Cáceres por haber sabido guiarnos con cariño en esta investigación, un agradecimiento especial a la MsC. Mercedes Balladares y al Ing. Félix Falconí

*Jeniffer Sánchez y Luis Marquez*

## **DEDICATORIA**

Con gran afecto dedico este trabajo a mi Amada Madre, por el apoyo a lo largo de mi vida velando siempre por mi formación personal al igual que a mi amado compañero de vida apoyándome de manera incondicional y a mi hijo por servirme de inspiración y motivación en superación personal .

*Jeniffer Paola Sánchez Martínez*

## **DEDICATORIA**

Al culminar mis estudios Universitarios dedico este trabajo de investigación a mis amados Padres a quienes les debo este éxito a mi amada esposa e hijos por la paciencia y apoyo brindado durante las largas jornadas de ausencia donde con mucho valor y fuerza supieron soportar la distancia.

*Luis Eduardo Marquez Once*

## ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	I
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN:.....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
<b>DEDICATORIA</b> .....	VI
<b>ÍNDICE</b> .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
RESUMEN .....	XI
SUMARY .....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
JUSTIFICACIÓN .....	3
OBJETIVOS .....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA.....	5
<b>PRÓSTATA</b> .....	5
<b>FISIOLOGÍA</b> .....	6
LÍQUIDO SEMINAL .....	6
PROTEÍNA P30 .....	7
DETECCIÓN DE LA P30 .....	7
MUESTRAS DONDE SE PUEDE ESTUDIAR LA DETERMINACIÓN DE P30.....	8
TEMPERATURA .....	8
TEMPERATURA AMBIENTE EN LA REGIÓN INTERANDINA .....	8
REFRIGERACIÓN .....	9
TIEMPO.....	9
PRINCIPIO DETRÁS DE ESTA PRUEBA .....	10
<b>FUNDAMENTO DEL MÉTODO</b> .....	10
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	11
SOPORTES SÓLIDOS.....	12
CARACTERÍSTICAS DEL LÍQUIDO SEMINAL EN LOS SOPORTES .....	12
RECOMENDACIONES PARA EL EMBALAJE DE INDICIOS .....	12
LA DESNATURALIZACIÓN PROTEICA .....	14
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	15



TIPOS DE INVESTIGACIÓN:.....	15
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	15
MÉTODO DE INVESTIGACIÓN .....	15
POBLACIÓN Y MUESTRA.....	16
PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRA SOBRE UN SOPORTE SÓLIDO .....	16
TÉCNICAS PARA EL PROCESO .....	17
ANÁLISIS DE DATOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	19
CONCLUSIONES:.....	29
RECOMENDACIONES:.....	30
BIBLIOGRAFÍA .....	31
<b>ANEXOS</b> .....	<b>33</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras a temperaturas controladas.....	19
Tabla 2 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras en refrigeración. ....	20
Tabla 3 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras en congelación. ....	22
Tabla 4: Características del estado de conservación de los soportes sólidos en sus temperaturas de estudio .....	24
Tabla 5 Comparación de resultados en los diferentes soportes sólidos influidos por la temperatura y tiempo .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 15°C .....	19
Figura N° 2: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 14.7°C .....	19
Figura N° 3: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 20°C .....	19
Figura N° 4: Resultado de P30 positivos y negativos a 5°C .....	21
Figura N° 5: Resultado de P30 positivos y negativos a 4°C .....	21
Figura N° 6: Resultado de P30 positivos y negativos a 8°C .....	21
Figura N° 7: Resultado de P30 positivos y negativos a 7°C .....	21
Figura N° 8: Porcentaje de P30 positivo y negativo a -20°C .....	22
Figura N° 9: Porcentaje de P30 positivo y negativo a -18°C .....	22
Figura N° 10: Porcentaje de P30 positivos y negativos a -27°C .....	22
Figura N° 11: Porcentaje de estado de conservación a refrigeración.....	24
Figura N° 12: Porcentaje del estado de conservación a temperatura controlada .....	24
Figura N° 13: Porcentaje de estado de conservación en congelación .....	25

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación "Influencia de la temperatura y el tiempo en la preservación de la proteína P30 en soportes sólidos" fue realizada con la finalidad de determinar este marcador en diferentes soportes sólidos como hisopados de genitales, internos y externos, prendas íntimas y de vestir, ropa íntima, sábanas, toallas, papel, guantes de manejo, alfombras a diferentes temperaturas guardadas previamente durante cinco años, como respaldo para el laboratorista en caso de cualquier experticia forense. Dicha proteína es detectada, aun cuando el presunto agresor sufra de azoospermia, o se halla sometido a vasectomía, cuya preservación fue demostrada con mencionada prueba, específicamente con un ensayo inmunocromatográfico, previo a la recuperación de dicha proteína mediante la técnica establecida que reaccionará con el anticuerpo monoclonal móvil antihumano P30 y un complejo antígeno-anticuerpo móvil que formara la segunda raya en el cassette, confirmando la positividad de la prueba al detectar proteína P30 en diferentes soportes sólidos donde se puede adherir líquido seminal. Considerando que para que la desnaturalización de dicha proteína, donde puede ser indetectable mediante la ayuda de esta prueba en el soporte sólido ocurre a temperaturas superiores a 90°C o más. Como resultado del análisis se reflejó que la congelación es la temperatura más óptima de conservar soportes sólidos considerando que la congelación preserva intacta la proteína P30 obteniendo un 100% de positividad, seguida de refrigeración obteniendo un 89% y temperatura ambiente un 87% tomando en cuenta que las muestras que salieron negativas no estuvieron embaladas ni conservadas de manera correcta.

**Palabras Claves:** Soportes sólidos, proteína P30, inmunocromatografía, vasectomía, azoospermia.

## ABSTRACT

The present research "Influence of the Temperature and the Time in the Preservation of the Protein P30 in Solid Supports was made with the purpose of determining this score in different solid supports as hisopados of genitals, internal and external intimate articles and dressing, intimate clothes, sheets, towels, paper, gloves of managing, carpets to different temperatures kept them previously before five years, as support for the laboratorist in case of any forensic expertise. The mentioned protein is detected, even if the supposed aggressor suffers of azoospermia, or submitted to vasectomy, which preservation was demonstrated by mentioned test, specifically by a test inmunocromatográfico, previously the recovery of the mentioned protein through of the established technology that will react with the antibody monoclonal mobile inhumanly P30 and one complex mobile antigen - antibody that was forming the second stripe in the cassette, confirming the positivity of the test on detected protein P30 in different solid supports where seminal liquid can stick fast. Considering that the denaturalization of the mentioned protein, where can be undetectable through the help of this test in the solid support that happen to high temperatures to 90°C or more. As a result of the analysis reflected that the freezing is the most ideal temperature of preserving solid supports thinking that the freezing preserves intact the protein P30 obtaining 100 % of positivity, followed by refrigeration obtaining 89 % and temperature sets 87 % taking account that the tests that came out negative they weren't packed and preserved in a correct way.

**KEYWORDS:** Solid supports, P30 protein, inmunochromatography, vasectomy, azoospermia.



Reviewed by: Chavez, Maritza

Language Center Teacher



## INTRODUCCIÓN

Uno de los inconvenientes de la preservación de las muestras biológicas es que no existe un artículo en el Código Integral Penal que delimite el tiempo para la conservación de dichas muestras vulnerando de esta manera el principio a la defensa y al principio de contradicción en casos de reapertura de casos <sup>(1)</sup>.

En el año 1935 Edmund Locard, considerado el Padre de las ciencias forenses manifestó “cada vez que se hace contacto con otra persona, lugar, o cosa, el resultado es un intercambio de materiales físicos” como por ejemplo huellas, elementos pilosos, máculas de sangre, líquidos corporales, líquido seminal, tejidos, entre otros, y como resultado de este principio, estos indicios que al ser analizados se convierten en evidencias que es lo que permite ayudar a determinar responsabilidad del hecho cometido <sup>(2)</sup>.

La determinación de proteína P30, una glicoproteína producida por la próstata que está presente en el semen humano, y que al pertenecer a la familia de proteínas, son sustancias químicas que forman parte de la estructura de las membranas celulares y es el constituyente esencial de las células vivas; sus funciones biológicas principales son la de actuar como biocatalizador del metabolismo y la de actuar como antígeno que por medio de una prueba inmunocromatográfica o reacción antígeno anticuerpo ayuda a esclarecer presuntos hechos de agresión sexual, esta proteína tiende a degradarse por factores como temperatura, tiempo, humedad y pH por lo cual es importante su preservación, razón que impulsa a efectuar esta investigación que se realizó en muestras conservadas hace cinco años preservadas a diferentes temperaturas <sup>(3)</sup>.

Una de las técnicas más rápidas y sencillas de diagnóstico utilizadas, mediante la utilización de antígenos (Ag) o Anticuerpos (Ac) es la llamada inmunocromatografía, técnica que se basa en el paso de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. En la zona del conjugado donde se encuentra un Ac., contra los epítomos del Ag que se desea detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno objeto de estudio formará un conjugado que viajará a través de esta membrana, de lo contrario viajarán por separado, posteriormente en la zona de test se encuentra un segundo anticuerpo específico contra otro epítome del Ag., el complejo formado por la unión Ag.-Ac. Quedará atrapado en esta zona y formará un color en línea que es el

indicativo de una prueba positiva. Finalmente en la zona de control se encuentra un tercer Ac. Que reconoce el reactivo de detección y que se une al conjugado libre, que finalmente al pintar la línea de color indica la validez del ensayo <sup>(4)</sup>.

Entre los soportes más comunes en delitos sexuales son las prendas íntimas, ropa, colchones, sábanas, toallas, entre otros. Debido a las características del semen y específicamente a la fructuosa un tipo de azúcar que hace que el semen sea pegajoso, y hace que sea posible su preservación e identificación en materiales textiles, entre otros. En materiales bien embalados y conservados la sensibilidad para su detección alcanza los 2 ng/ml.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Según la OMS la violencia sexual es todo acto en forma directa, indirecta, física psicológica, verbal escrita o en cualquier otra forma de interacción con el prójimo, donde no existe un consenso o consentimiento de ambas partes, independientemente del lugar, edad, sexo o religión donde, se vulnera la privacidad de una persona y el derecho de elegir cuando, como, dónde y con quien compartir su vida sexual, generando todos los perjuicios físicos y psicológicos como consecuencia de este acto delictivo <sup>(5)</sup>.

Según el COIP (Código Orgánico Integral Penal) en su parágrafo primero de Delitos de violencia contra la mujer o miembros del núcleo familiar en su artículo 158 manifiesta que *“La persona que, con manifestación de violencia contra la mujer o miembro de núcleo familiar, se imponga a otra y la obligue a tener relaciones sexuales u otras prácticas análogas, serán sancionadas con las penas previstas en los delitos contra la integridad sexual y reproductiva”* El cual determina hasta 25 años de cárcel <sup>(6)</sup>.

A nivel mundial evidenciar la presencia de semen en todo acto relacionado a delitos sexuales es el objetivo más grande que persiguen y se han propuesto las autoridades y los investigadores en ciencias forenses. En consecuencia y debido a que está demostrado estadísticamente que se puede recuperar evidencia física en el lugar de los hechos y o víctimas, se implementó como una prueba aceptada por las autoridades competentes la técnica de ABACard P30 que alcanza una sensibilidad de 0.4 ng/ul, a nivel latinoamericano el ABACard P30 es una técnica validada internacionalmente para estos procedimientos en el área forense <sup>(7)</sup>.

En Ecuador esta es la técnica que actualmente se utiliza en los laboratorios de ciencias forenses, razón que motiva y por la cual se hace evidente la necesidad de conocer los

factores como el tiempo y la temperatura, esta prueba está diseñada para alcanzar una sensibilidad que llega a las 72 horas pos coito o en casos de agresión sin penetración en los perjurios sexuales. Cuando y en consecuencia a los factores mencionados la muestra se puede perder, debido al hecho de que es un líquido que se puede degradar como consecuencia de sus características y a que las víctimas realizan las denuncias después de horas, días o aún más tiempo de transcurrido el quebrantamiento de su integridad por miedo, vergüenza, amenazas u otros factores inherentes al acto, lo que puede arrojar falsos negativos, en consecuencia a un mal embalaje lo que no permite la preservación de esta muestra de líquido seminal, deslizando responsabilidades. Estos factores son las variables que se procederá a investigar mediante la realización del test de ABACard P30 en los diferentes soportes sólidos previamente conservados en un tiempo determinado estimado de 5 años y a diferentes temperaturas, mediante lo cual se evidenciará el tiempo y temperatura real en la cual esta proteína se conserva en los soportes donde fueron hallados, para su determinación.

## **JUSTIFICACIÓN**

Gracias a la realización de este ensayo se contribuirá a corroborar o confirmar la eficacia de la preservación de P30 estableciendo métodos, protocolos, mediante la observación de los factores que afectan o degradan a esta proteína y así de esta manera mantener intacto el indicio que se convirtió en evidencia y luego en una prueba de la presunta culpabilidad del agresor sexual, mediante, la presencia de líquido seminal aun cuando el agresor no eyacule, sufra de azoospermia, o se halla sometido a la vasectomía, la presencia de dicha proteína aparecerá y ayudará a determinar responsabilidades con un examen complementario como la tinción Christmas Tree (árbol de navidad), además de un examen de ADN posterior que será aplicado en personas víctimas de un presunto delito sexual con la finalidad contribuir a una correcta aplicación de justicia en conformidad a los establecido en el COIP en vigencia. El propósito de la investigación es la determinación de la influencia de la temperatura y tiempo de la proteína de origen prostático humano (P30) en soportes sólidos, cuya preservación se demostrada con la prueba de detección de esta proteína, específicamente con el ensayo inmunocromatográfico, en los diferentes soportes sólidos que contienen las características necesarias donde se puede adherir líquido seminal, como por ejemplo las prendas de vestir, alfombras, colchones, prendas íntimas entre otras.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar cómo afecta la temperatura y tiempo en la preservación de proteína P30 en soportes sólidos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar las muestras preservadas de diferentes soportes sólidos.
- Determinar la proteína P30 en los diferentes soportes sólidos.
- Comparar los resultados en los diferentes soportes sólidos influidos en la temperatura y tiempo.

## **ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA**

Uno de los principales problemas que se presenta en los delitos de índole sexual es el demostrar la presencia de semen a través de la detección de la proteína P30 en las presuntas víctimas.

Debido a diferentes factores que afectan a su preservación como el tiempo y la temperatura en los diferentes soportes en los que se presume la presencia de dicho líquido, además de la ausencia de espermatozoides, por razones tales como vasectomía o azoospermia, razones por la cual las ciencias forenses han aceptado como un marcador válido la técnica de detección del antígeno específico de próstata o P30<sup>(7)</sup>.

La preservación de la escena del hecho o indicios según ordena el COIP en su artículo 458, está a cargo del servidor público que tome contacto en primer lugar con la escena e indicios en primer lugar, luego el personal especializado del Sistema integral de investigación de medicina legal y ciencias forenses es el encargado de la preservación de estos indicios específicamente para este proyecto las prendas o cualquier soporte con semen, que lamentablemente es necesario recalcar que en el COIP aún existen vacíos en el aspecto relacionado al tiempo real en la que una muestra biológica debe ser conservada , lo cual genera una necesidad imperante en consecuencia de que los principios constitucionales y penales que nos rigen en la actualidad permite el derecho a la defensa, al principio de contradicción y de igual manera en la reapertura de casos<sup>(1)</sup>.

### **PRÓSTATA**

Glándula impar y única situada debajo de la vejiga rodea la uretra y los conductos eyaculadores miden 4 cm. de longitud por 3 cm. de alto y 2 de ancho, produce un líquido con un pH de 6.5 y está compuesto por:

- Ácido cítrico.- utilizado por los espermatozoides quienes a través del ciclo de Krebs obtiene ATP (Adenín Tri Fosfato).
- Enzimas proteolíticas.- tales como el PSA o P30, pepsinógeno, lisozimasa, amilasa y hialuronidasa cuya función es descomponer las proteínas producidas por las vesículas seminales encargadas de la coagulación.
- Fosfatasa ácida.- cuya función es desconocida.

- Seminoplasmina.- antibiótico natural que restringe el crecimiento bacteriano en la cavidad vaginal <sup>(8)</sup>.

## **FISIOLOGÍA**

La formación del Líquido seminal inicia en los tubos seminíferos de los testículos, dando inicio con la espermatogénesis gracias a la acción de las hormonas testosterona y la Folículo Estimulante, luego a medida que van creciendo los espermatozoides pasan al epidídimo para su maduración en el cual pasaran de 10 a 14 días.

Una vez que el espermatozoide ha alcanzado su nivel fertilizante y de movilidad los conductos deferentes los transportan hacia la uretra; las vesículas seminales producen una espesa secreción que representara entre el 60% al 80 % que envolverá a los espermatozoides, esta sustancia es rica en fructosa lo cual servirá de energía a los espermatozoides para llegar al ovulo, además de ello la próstata también aporta entre un 15% a 30% del total con líquido prostático que es rico en enzimas y ácido cítrico que en combinación con el líquido de las vesículas seminales darán un pH ligeramente alcalino entre 7,2 y 7,8 característico y óptimo para que las células sexuales masculinas cumplan su función. Además de ello las glándulas de Cooper aportan con un 10 % del total que secretan líquido lubricante.

## **LÍQUIDO SEMINAL**

Compuesto principalmente por líquido seminal formado por las secreciones de la próstata, glándulas bulbouretrales, túbulos seminíferos, las vesículas seminales y espermatozoides, el volumen por eyaculación varía entre 2.5 y 5 ml normalmente, dentro del cual existen de 50 a 150 millones de espermatozoides.

Aunque el líquido prostático le confiere acidez, el semen es ligeramente alcalino entre 7,2 y 7,7, este líquido es el medio ideal de transporte, protección del medio ácido hostil además de conferirle nutrientes necesarios para cumplir con su función, después de la eyaculación alrededor de los 5 minutos se coagula, sin embargo entre los 10 a 15 minutos se vuelve líquido debido a la acción de proteínas como el PSA o P30 <sup>(8)</sup>.

## **PROTEÍNA P30**

La proteína P30 o Antígeno Prostático Específico (PSA) es una glicoproteína producida por la glándula prostática en el varón, en muestras de semen el promedio de PSA es mayor a 820.000 ng/ml<sup>(9)</sup>.

La proteína P30 es una kaliceína secretada por la próstata, es una proteasa desnaturizante sobre las semenogelinas, descubiertas en 1930 y llamadas enzimas proteolíticas, aislada en el tejido prostático en 1970, y utilizada para identificación del semen de violadores en 1973 por Li y Beling, la Kaliceína 3 es una glicoproteína de cadena simple que tiene un peso molecular de 33.000 daltons compuesto de 237 aminoácidos.

La principal función es la licuefacción del semen al contrario de la semenogelina que protege a los espermatozoides al producir la coagulación<sup>(10)</sup>.

## **DETECCIÓN DE LA P30**

La prueba para la detección de la P30 es una técnica forense nueva donde se detecta la presencia de esta proteína en el plasma seminal que es una glicoproteína de ese origen, que es idéntica al antígeno de próstata específico, y que corrientemente viene siendo estudiado como un marcador de cáncer en la próstata. La proteína llamada P30 no ha sido encontrada en ninguna de las secreciones femeninas, por lo que es exclusivamente masculina. Es importante recordar que la ausencia de espermatozoides, no garantiza la entelequia de una agresión sexual.

Los espermatozoides pueden no ser encontrados si han transcurrido más de 24 horas entre el asalto y la recolección de la evidencia, como consecuencia de azoospermia, vasectomía, degradación o si el atacante no eyaculó, pero si puede ser encontrar la proteína P30, esto último es poco conocido entre los ofensores sexuales<sup>(11)</sup>.

La proteína P30 es un marcador aceptado internacionalmente para la detección de líquido seminal en casos donde se sospecha abuso sexual, es detectable también en individuos con vasectomía y azoospermia<sup>(12)</sup>.

## **MUESTRAS DONDE SE PUEDE ESTUDIAR LA DETERMINACIÓN DE P30**

Cuando los peritos forenses han realizado el examen completo de la escena del crimen se procede al levantamiento de los indicios donde se presume la presencia de este líquido con la ayuda de la luz forense.

- Hisopados Genitales: Genitales internos y externos, periné y ano
- Hisopados Paragenitales: Superficie interna de los muslos, nalgas, pubis.
- Hisopados Extragenitales: Superficie externa restante de la cavidad genital<sup>(13)</sup>.

Existen muchos casos en los que los fluidos biológicos como el semen se deben retirar de soportes sólidos (prendas de vestir, sábanas, toallas, papel y otros) para posterior estudio de la proteína P30.

Para estos casos, debemos recurrir a un procedimiento llamado levantamiento de evidencias en donde recuperamos los fluidos biológicos para estudio.

## **TEMPERATURA**

Se puede definir temperatura como el grado de energía térmica calor medida en una escala definida.

La temperatura de un cuerpo es su intensidad de calor, o sea la cantidad de energía que puede ser transferida a otro cuerpo<sup>(14)</sup>.

Para nuestro estudio se tomó en cuenta al hecho de que es un líquido que se puede degradar como consecuencia de sus características y se estudió tres temperaturas la ambiental, en refrigeración, y congelación como base de estudio dentro de las cuales se detallará las diferentes temperaturas en donde se conservó las muestras que se estudió.

## **TEMPERATURA AMBIENTE EN LA REGIÓN INTERANDINA**

Se puede definir temperatura como el grado de energía la temperatura ambiente es aquella que puede ser medida en un sitio y momento determinado, sin embargo desde el punto de vista científico se ha tomado como temperatura ambiente la que se encuentra los 20 °C y los 25 °C, es decir, que el promedio de éstas es de 23 °C<sup>(15)</sup>.

## **REFRIGERACIÓN**

La refrigeración consiste en extraer la energía térmica de un cuerpo para reducir su temperatura. Por las propiedades termodinámicas, dicha energía es transferida hacia otro cuerpo. Cabe destacar que el frío propiamente dicho no existe, sino que la temperatura es el reflejo de la cantidad de energía que posee un cuerpo <sup>(16)</sup>.

Pueden precisarse temperaturas de refrigeración de 4 a 8° C y de 0 a 4° C, para conservación de sustancias líquidas <sup>(17)</sup>.

## **CONGELACIÓN**

Todos los microorganismos detienen su actividad microbiana cuando alcanzan una temperatura inferior a los – 10°C. Usualmente cuando son almacenados entre – 18 y - 25° C. los microorganismos no mueren pero ya no pueden alimentarse ni desarrollarse, la velocidad de las reacciones químicas se reducen notablemente <sup>(18)</sup>.

Es importante la congelación rápida de los tejidos que deseamos preservar debido a que podemos congelar las soluciones acuosas intra y extra celular, cuando la congelación es lenta solo congelamos el agua pura extra celular que es la que sufre el cambio de estado y quedando solamente los sólidos generando un desequilibrio que es compensado por mecanismos osmóticos dando como resultado una célula deshidratada y la desnaturalización de las proteínas.

Estudios han demostrado que las proteínas no se ven afectadas por los procesos de congelación <sup>(19)</sup>.

## **TIEMPO**

Las proteínas como cualquier estructura orgánica tienen un tiempo de vida variable dependiendo de su función y estructura, las células cambian su composición proteica para poder cumplir con diferentes funciones.

Por ejemplo la hemoglobina tiene un tiempo de vida de aproximadamente 120 días, por otra parte las células del cristalino del ojo no son reemplazadas y las neuronas no se regeneran <sup>(20)</sup>.

## **PRINCIPIO DETRÁS DE ESTA PRUEBA**

Si P30 está presente en la muestra de semen, reaccionará con el anticuerpo monoclonal antihumano P30 y se forma así un complejo de anticuerpo antígeno móvil. Este complejo anticuerpo-antígeno móvil migra a través del dispositivo absorbente hacia el área de prueba T. En el área de prueba "T", se encuentra inmovilizado un anticuerpo P30 antihumano monoclonal. Este anticuerpo inmovilizado captura el complejo anterior de modo que se forma un emparedado de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Las partículas de colorante rosado conjugado se concentran en una zona estrecha de la membrana. Cuando la concentración de P30 en la muestra excede de 4 ng / ml, las partículas de colorante rosado formarán una banda de color rosa en el área de prueba T "indicando un resultado positivo. Como control positivo interno, los conjugados de anticuerpo P30 no pueden unirse al anticuerpo en el área de prueba T, pero son capturados por un anticuerpo inmovilizado de inmunoglobulina presente en el área de control 'C' que forma un complejo. Las partículas de colorante rosado capturadas formarán una banda en el área de control 'C', lo que indica que la prueba funcionó correctamente y se siguieron los procedimientos adecuados. Por lo tanto, la presencia de dos líneas de color, una en el área de prueba T y otra en el área de control "C" indica un resultado positivo, mientras que una línea solo en el área de control "C" indicará un resultado negativo (siempre que no haya un "efecto de gancho de dosis alta")<sup>(21)</sup>.

## **FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

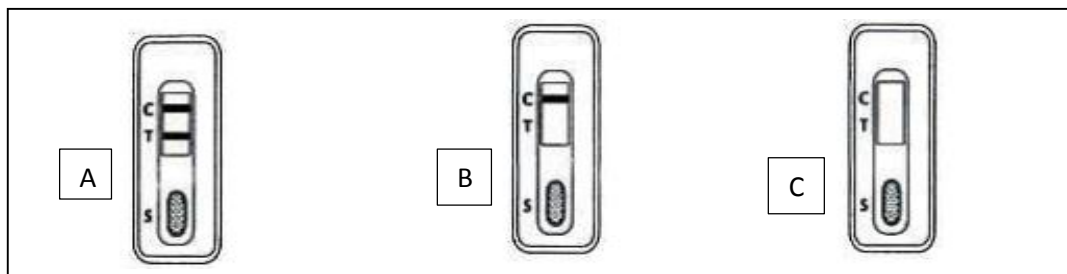
En este procedimiento, 750µl de muestra es adicionado al pocillo "S". Si P30 está presente en la muestra de semen esta reaccionará con el anticuerpo monoclonal móvil antihumano P30 y un complejo antígeno-anticuerpo móvil se forma entonces. Este complejo móvil antígeno-anticuerpo migra a través del dispositivo absorbente hacia el área "T" de la prueba.

En el área "T" un anticuerpo monoclonal anti humano P30 es inmovilizado. Este anticuerpo inmovilizado captura el complejo de arriba, formando un Sándwich anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El conjugado concentrado de partículas se colorea en rosa en una zona estrecha sobre la membrana. Cuando la concentración de P30 en la muestra excede 4ng/ml las partículas marcadas en rosa formarán una banda coloreada rosa en el área "T" del test indicando un resultado positivo de la prueba. Como un

control positivo, los anticuerpos conjugados P30 marcados no pueden ligarse al anticuerpo en el área “T” de la prueba pero son capturados por un anticuerpo anti inmunoglobulina inmovilizado presente en el área “C” del control formado un complejo.

Las partículas marcadas en rosa capturadas formarán una banda en el área “C” del control indicando que el test funcionó correctamente y los procedimientos apropiados se siguieron. La presencia de dos líneas coloreadas, una en el área “T” y otra en el área “C” podrían indicar un resultado negativo (siempre que no haya un “efecto prozona de la dosis alta”)<sup>(21)</sup>.

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Fuente: Manual de Procedimiento de laboratorio de Biología forense

Imagen 1: La imagen A me representa con resultados positivo, La imagen B indica un resultado negativo y la imagen c me indica un resultado no valido <sup>(12)</sup>.

**Positivo:** Si existen dos líneas rosadas, una en el área “T” de la prueba y en el área control “C”, el resultado es positivo e indica que los niveles de P30 están sobre 4 ng/ml

**Negativo:** Si existe solo una línea rosada en el área de control “C” el test es negativo.

Esto puede indicar que:

a) La sensibilidad es menor a 4ng/ml en diez minutos.

b) Presencia de efecto prozona.

Que podría dar un resultado falso negativo debido a la presencia de altas concentraciones de P30 en la muestra, como por ejemplo líquido seminal no diluido. En este caso la muestra de ser ensayada nuevamente usando una dilución 10 a 10.000.

**Inválido:** Si no existe línea rosada visible en el área de control “C” el test no es concluyente. Repetir el test y examinar el procedimiento cuidadosamente.



**Control de calidad:** La línea control en el área de control “C” puede ser considerada un control interno del procedimiento. Otra línea rosada aparecerá siempre si el test se ha desarrollado correctamente.

Si la línea de control “C” no aparece el test es inválido y un nuevo test debe ser desarrollado siguiendo los correctos procedimientos. Se podría realizar un test de control de calidad usando estándares de controles positivo y negativo <sup>(12)</sup>.

## **SOPORTES SÓLIDOS**

Un soporte sólido es toda superficie que contiene las características necesarias donde se puede adherir líquido seminal como prendas íntimas, ropa, alfombras, colchones, piso paredes, u otros soportes sólidos <sup>(22)</sup>.

## **CARACTERÍSTICAS DEL LÍQUIDO SEMINAL EN LOS SOPORTES**

Sobre materiales absorbentes las manchas de semen presentan un color grisáceo que con el tiempo puede cambiar a amarillento, si este material es flexible como por ejemplo las telas el semen presentará un aspecto apergaminado al tacto. Sobre soportes no absorbentes al secarse tiene una característica muy especial que se asemeja con un depósito constituido por una película o escamas brillantes, la luz ultravioleta evidenciará una fluorescencia amarilla que aunque no es específica es de gran ayuda para localizar en el lugar de los hechos. Cuando la mancha se encuentra en soportes no transportables como colchones tapices o paredes, se deberá recolectar la muestra muy cuidadosamente debido que al secarse su consistencia apergaminada es fácilmente desprendible lo que puede provocar pérdida del indicio, este problema se complica en soportes no absorbentes donde la película o escamas brillantes se desprende al tacto <sup>(23)</sup>.

## **RECOMENDACIONES PARA EL EMBALAJE DE INDICIOS**

- Manipular lo menos posible y siempre embalar la evidencia en forma individual (por separado), identificándolos por su tipo, característica y ubicación.
- Los materiales más recomendables para el embalaje son: sobres de papel, cajas con tapa, bolsas de primer uso o bolsa transparente con cierres

herméticos, envases de plástico (esterilizados de boca ancha con tapa rosca, tubos y frascos con tapa)

- Registrar fotográficamente, siempre que sea posible, los indicios antes de su embalaje, durante el embalaje y al finalizar su embalaje y rotulado.
- Embalar los indicios inventariados en el empaque o contenedores adecuados (limpios y estériles, de tamaño apropiado), de acuerdo a las técnicas y protocolos de recolección.

Nota. Si se trata de prendas húmedas o fragmentos de tela que contengan manchas húmedas y, no se dispone de tiempo para el secado, introducir en bolsa de papel con un rótulo que diga **“INDICIO MOJADO, FAVOR PONER A SECAR INMEDIATAMENTE”**

Sellar el contenedor o embalar con la cinta establecida o con los medios adecuados que brinden seguridad y preservación tanto al embalaje como al indicio.

Cuidado de las evidencias de líquido seminal:

- a. En materiales porosos o absorbentes, se presentan de color grisáceo, que cuando envejecen se tornan amarillentos, presentan bordes irregulares (a manera de mapa geográfico) y si el soporte es flexible adquieren una consistencia apergaminada o acartonada al tacto y en lo posible se deberán remitir con su soporte o en caso contrario se recogerán las muestras con ayuda de hisopos de algodón estéril, empapados en agua destilada y luego secados al ambiente.
- b. En materiales compactos, no absorbentes, dejan un depósito constituido por una película de escamas brillosas costrosas, en estos casos se pueden raspar y retirarlos de la superficie sobre la cual están adheridos y guardarlos en sobres de papel nuevo y limpio.
- c. En la piel forma débiles películas brillantes de aspecto barnizado, las cuales pueden ser retiradas con una pinza limpia o raspadas con un bisturí nuevo y limpio y guardados en sobres de papel nuevos y limpios.
- d. Las muestras que deben enviarse para estudio:
  - Prendas de vestir de la víctima
  - Prendas de vestir del sospechoso o persona incriminada

- Prendas de cama
- Hisopo o líquidos del lavado vaginal, rectal o bucal (en el caso de la persona de sexo femenino) o en su defecto solicitar examen bio-forense en la persona, para la toma de la muestra adecuada.
- Hisopo o líquidos del lavado balanoprepucial o rectal (en el caso de la persona de sexo masculino) o en su defecto solicitar examen bio-forense en la persona, para la toma de la muestra adecuada.
- Condones, con datos referentes a donde se los encontró, condiciones de recolección y marca.
- Papel higiénico, que hayan sido utilizado luego del delito <sup>(24)</sup>.

## **LA DESNATURALIZACIÓN PROTEICA**

Cuando se hierve una solución de una proteína, la proteína frecuentemente se vuelve insoluble, es decir, se desnatura, y permanece insoluble incluso cuando la solución se enfría. La desnaturación de las proteínas de la clara de huevo por calor, como cuando se hierve un huevo, es un ejemplo de desnaturación irreversible. La proteína desnaturada tiene la misma estructura primaria que la proteína original o nativa. Sin embargo, las fuerzas débiles entre los grupos cargados y las fuerzas más débiles de atracción mutua de grupos no polares se ven alteradas a temperaturas elevadas; como resultado, la estructura terciaria de la proteína se pierde. En algunos casos, la estructura original de la proteína puede regenerarse; el proceso se llama renaturalización <sup>(25)</sup>.

Algunas de las proteínas más pequeñas, sin embargo, son extremadamente estables, incluso contra el calor; por ejemplo, las soluciones de ribonucleasa pueden exponerse durante cortos periodos de tiempo a temperaturas de 90 ° C (194 ° F) sin experimentar una desnaturación significativa. La desnaturación no implica cambios idénticos en las moléculas de proteínas. Sin embargo, una propiedad común de las proteínas desnaturadas es la pérdida de actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de actuar como enzimas u hormonas. Aunque la desnaturación se había considerado durante mucho tiempo una reacción de todo o nada, ahora se piensa que existen muchos estados intermedios entre la proteína nativa y la desnaturada. Sin embargo, en algunos casos, la ruptura de un enlace clave podría ir seguida de la ruptura completa de la conformación de la proteína nativa <sup>(25)</sup>.

## **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **TIPOS DE INVESTIGACIÓN:**

**Descriptiva:** A través del cual se detalló la investigación y el procedimiento realizado, mediante el cual se determinó las características y diferencias principales de la técnica aplicada.

**Cuasi Experimental:** Debido a que es una derivación de un estudio ya realizado en el cual se evaluó la existencia de P30 en muestras conservadas hace cinco años a diferentes temperaturas.

### **DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

**Bibliográfica:** Basada en la recopilación de información consultada en revistas, bibliotecas, sitios web, libros, blogs y revistas virtuales para en base a la lectura comprensiva extraer resúmenes útiles en la investigación sustentadas dentro de un marco teórico.

**De Laboratorio:** Se realizó una aproximación de tipo exploratoria, ya que se permaneció en contacto directo con las muestras previamente conservadas, además esta investigación está basada en hechos reales, manipulando las variables para obtener resultados útiles en el informe final.

### **MÉTODO DE INVESTIGACIÓN**

**Cualitativo:** Mediante este método se ayudó a determinar la presencia o ausencia de proteína P30 en muestras previamente conservadas durante cinco años.

**Cuantitativo:** Mediante este método se determinó en cuantas muestras preservadas a diferentes temperaturas por el lapso de cinco años, se obtuvo P30 positivo y negativo.

#### **Tipo de estudio:**

**Transversal:** Debido a que se realizó en un periodo de tiempo determinado entre Octubre 2017-Febrero 2018

## **POBLACIÓN Y MUESTRA**

**Población:** Cincuenta muestras previamente en preservación a diferentes temperaturas.

**Muestra:** Se trabajó con el total de la población conservada durante cinco años.

### **Técnicas e Instrumentos de recolección de Datos:**

**Técnicas:** Observación

**Instrumento:** Guía de Observación y Técnica.

## **PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRA SOBRE UN SOPORTE SÓLIDO**

1. Observar el soporte sólido en la luz forense.
2. Identificar la zona en donde existe fluorescencia para determinar la ubicación del supuesto fluido biológico.
3. La extracción de muestras en soportes sólidos se realizará mediante un corte de 0.5 x 0.5 cm. o con un corte longitudinal en el hisopo.
4. Se procede a colocar en un tubo ependorf.
5. Agregar una alícuota con 750 ul de buffer de extracción.
6. Agitar en un dispositivo Vortex por 5 minutos.
7. Colocar en refrigeración por dos horas (2-8°C) Este procedimiento recupera aproximadamente el 99% de P30 extraída del hisopo.
8. Se pone la muestra en el Vortex cada 20 minutos mientras reposa en refrigeración.
9. Dejar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
10. Centrifugar la muestra 3 minutos a 3.600 rpm después del paso de extracción.
11. Remover el dispositivo y el gotero del paquete sellado.
12. Etiquetar el dispositivo con el número de caso.
13. Adicionar 300ul (6-7gotas con el gotero) de la muestra al pocillo "S" del dispositivo.
14. Leer los resultados a los 10 minutos.
15. Esta alícuota podría ser almacenada entre 2-8 ° C sino se usa inmediatamente.

Los resultados positivos se pueden ver después de un minuto dependiendo de la concentración de P30.

Para resultados negativos se deben esperar 10 minutos<sup>(12)</sup>.

## **TÉCNICAS PARA EL PROCESO**

La técnica utilizada para el análisis y procesamiento de las muestras impregnadas en los diferentes soportes consistió en tres etapas:

La primera etapa consistió en la observación, proceso dentro del cual se pudo identificar el número real de muestras a analizar, se logró observar los tipos de soportes donde se encontraban las muestras de líquido seminal y se consiguió caracterizar todas y cada una de ellas con lo que se consiguió obtener datos estadísticos relevantes que a la postre aportaron con datos relevantes de su estado de conservación previo al análisis.

En la segunda etapa se procedió a cumplir con las normas establecidas para la recuperación de la proteína del soporte donde se encuentra la muestra de líquido seminal de acuerdo al inserto de la prueba.

Las muestras o hisopos congelados se deben descongelar por completo y llevar a temperaturas entre 2-8 ° C.

A estas muestras colocadas en un tubo ependorf se debe agregar 750 ul de tampón de extracción durante 2 horas a temperaturas entre 2-8° C. este procedimiento recupera aproximadamente el 99% de la P30 extraíble en el hisopo

"Centrifugue la muestra anterior durante 3 minutos después de la etapa de extracción anterior. Retire 300 ul del sobrenadante para fines de prueba. Esta alícuota se puede almacenar entre 2-8° C si no se usa de inmediato. Inmediatamente antes de la prueba de uso, la muestra debe volver a temperatura ambiente. La muestra restante puede usarse para análisis adicionales de ADN.

En la tercera etapa se realizó una prueba rápida de cassette o inmunocromatográfica cumpliendo con los pasos establecida en el inserto de la prueba.

## **PROTOCOLO DE PRUEBA**

- 1 Tome la muestra del sitio de almacenamiento.
- 2 Retire el dispositivo y el cuentagotas de la bolsa sellada.
- 3 Etiquete el dispositivo con el número de caja

4 Agregue 200 ul (o 6-7 gotas con el gotero) de muestra al pozo sámpico 'S' del dispositivo de prueba.

Los resultados de esta prueba inmunocromatográfica se leerán a los 10 minutos.

Los resultados positivos se pueden ver a una velocidad de 1 minuto, dependiendo de la concentración de la proteína. Para los resultados negativos, se debe esperar 10 minutos completos <sup>(21)</sup>.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Para este estudio investigativo se empleó un sistema estadístico mediante la ayuda del programa informático Excel donde se analizó el total de muestras previamente conservadas hace cinco años.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

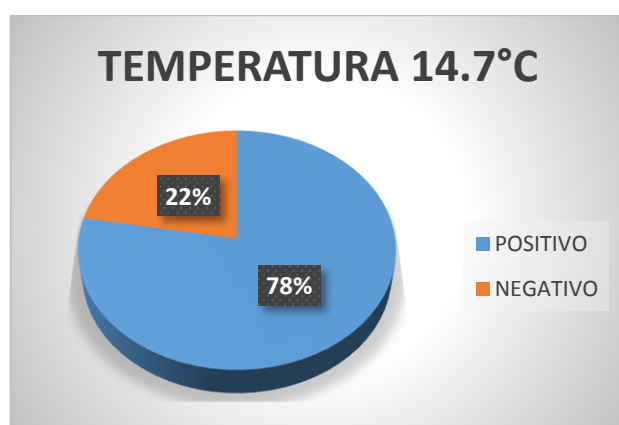
Con el fin de evaluar cómo afecta la temperatura y el tiempo en la proteína P30 caracterizo determinó y comparó los resultados de la temperatura y tiempo de diferentes soportes sólidos.

*Tabla 1 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras a temperaturas controladas*

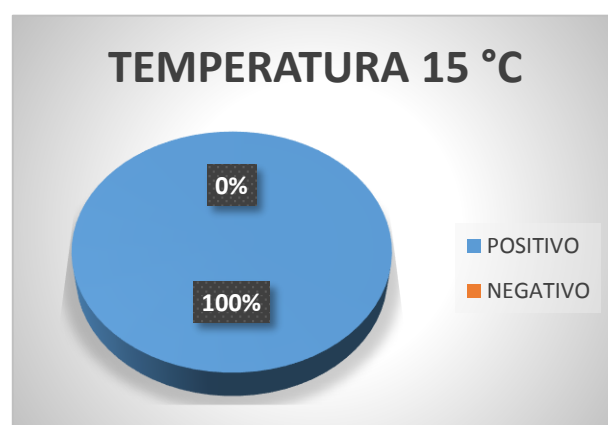
TEMPERATURA	NUMERO DE MUESTRAS	P30 POSITIVOS	PORCENTAJE POSITIVOS	RESULTADOS NEGATIVOS	P30 NEGATIVOS
14.7	9	7	77.8%	2	22.2%
15	8	8	100%	0	0%
20	6	5	83.3%	1	16.7%

*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*

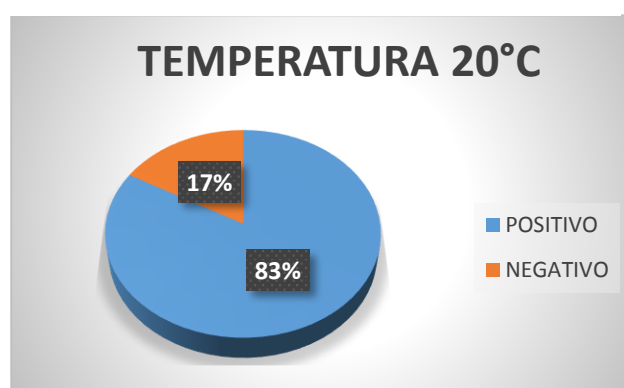
*Figura N° 2: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 14.7°C*



*Figura N° 1: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 15°C*



*Figura N° 3: Porcentaje de P30 positivo y negativo a 20°C*



*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*



Se analizó tres diferentes temperaturas controladas:

De las 9 muestras que se analizaron a 14.7°C, 7 que representa el 77.8% arrojaron resultados positivos y 2 que representa el 22.2% negativos.

De las 8 muestras que se analizaron a 15°C, se obtuvo el 100% de P30 positivo.

Finalmente las 6 muestras que se analizaron a 20°C, 5 el 83.3% fueron P30 positivos y 1 que es el 16.7% P30 negativo.

Se hace notorio el resultado positivo en el 100% de muestras donde no hubo un deterioro significativo de los soportes sólidos con muestras de líquido seminal, lo que indica que en estos soportes la proteína en las temperaturas mencionadas y a pesar del paso de cinco años, aún conserva suficiente muestra que permite la obtención de un resultado positivo.

En las tres muestras que se analizaron y en las que precisamente se obtuvo P30 negativo se observó la presencia de hongos ya sea porque no cumplieron con los procedimientos de levantamiento, embalaje, transporte o conservación correspondiente, donde se pudo haber vulnerado uno o varios de estos procedimientos y que como consecuencia produjo en las prendas íntimas femeninas proliferación de hongos, o la pérdida de muestra.

Esta es la principal razón que impulsa a la realización de un control de calidad del estado de conservación de los mencionados soportes que en este preciso caso son prendas íntimas y que motiva a la realización de esta prueba que finalmente valida la presencia o no de la proteína P30

*Tabla 2 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras en refrigeración.*

TEMPERATURA	NÚMERO DE MUESTRAS	P30 POSITIVOS	PORCENTAJE POSITIVOS	RESULTADOS NEGATIVOS	P30 NEGATIVOS
4	5	5	100%	0	0%
5	4	3	75%	1	25%
7	3	3	100%	0	0%
8	6	5	83.3%	1	16.6%

*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*

Figura N° 5: Resultado de P30 positivos y negativos a 4°C

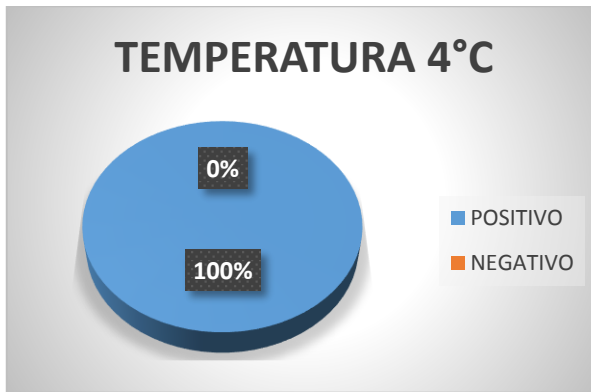


Figura N° 4: Resultado de P30 positivos y negativos a 5°C

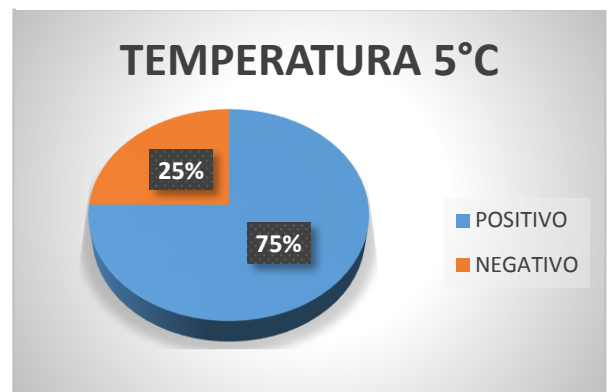


Figura N° 7: Resultado de P30 positivos y negativos a 7°C

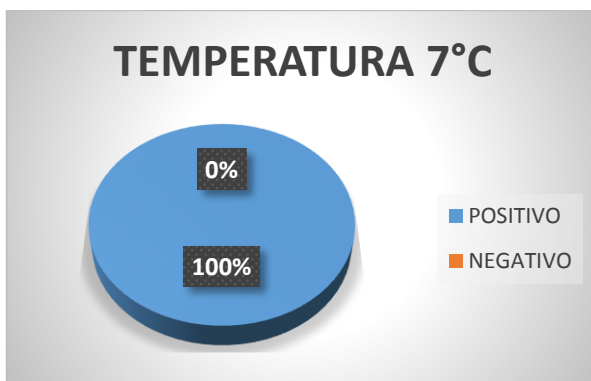
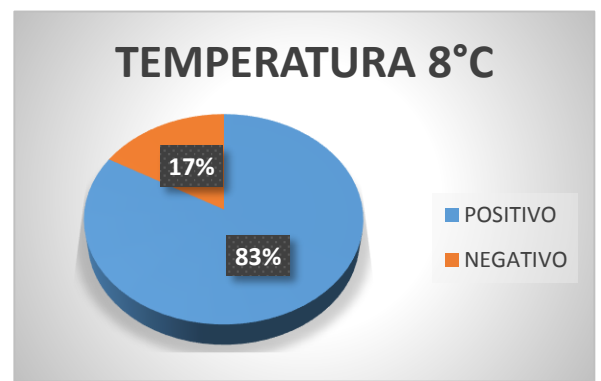


Figura N° 6: Resultado de P30 positivos y negativos a 8°C



FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once

Se analizó cuatro diferentes temperaturas en refrigeración:

Entre las 5 muestras que se analizó a 4°C se obtuvo un 100% de resultados positivos.

Al analizar las 4 muestras preservadas a 5°C, en 3 equivalente al 75% se encontró P30 positivos y 1 que es el 25% resultó negativa.

De las 3 muestras que se analizó a 7°C el 100% de estas muestras fueron positivas

De las 6 muestras que se analizó a 8°C, se encontró que el 83.3% que son 5 de estas muestras presentaron P30 positivo y la muestra restante el 16.6% fue negativa.

En el análisis de muestras en las que se obtuvieron resultados positivos se puede indicar que su estado de preservación al momento del análisis era bueno por lo que no hubo interferencia de otros factores a excepción del tiempo y la temperatura.

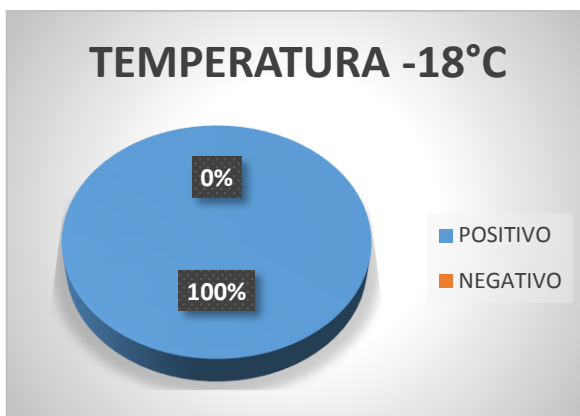
De las dos muestras del total analizadas que se obtuvo P30 negativo en refrigeración fueron de una alfombra y una toalla higiénica, que al momento del levantamiento de indicios estuvieron húmedas y los peritos no dejaron secar para embalar, por lo que al momento instantáneo de hacer el análisis obtuvieron P30 positivo pero con la preservación de cinco años atrás obtuvimos P30 negativo al haber en las prendas mencionadas hongos.

*Tabla 3 Resultados obtenidos del procesamiento de muestras en congelación.*

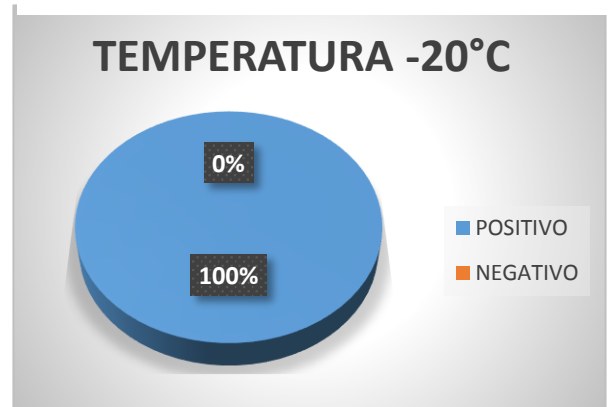
TEMPERATURA	NUMERO DE MUESTRAS	P30 POSITIVOS	PORCENTAJE POSITIVOS	RESULTADOS NEGATIVOS	P30 NEGATIVOS
-18	3	3	100%	0	0%
-20	2	2	100%	0	0%
-27	4	4	100%	0	0%

*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*

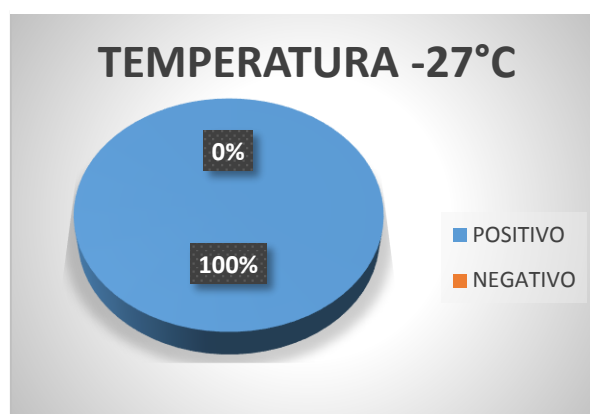
*Figura N° 9: Porcentaje de P30 positivo y negativo a -18°C*



*Figura N° 8: Porcentaje de P30 positivo y negativo a -20°C*



*Figura N° 10: Porcentaje de P30 positivos y negativos a -27°C*



*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*

Se analizó tres diferentes temperaturas en congelación:

Del total de 3 muestras que se analizó a  $-18^{\circ}\text{C}$ , el 100% fueron P30 positivo.

De las 2 muestras que se analizó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se obtuvo P30 positivo en el 100% analizado.

De las 4 muestras que se analizó a  $-27^{\circ}\text{C}$ , se encontró el 100% de resultados positivos.

Con los resultados obtenidos del presente análisis se pudo comprobar que la congelación es la mejor temperatura para preservar indicios que contienen líquido seminal, además cabe recalcar que las muestras que se investigaron a esta temperatura como los hisopos, guantes de vinilo, preservativos y papel higiénico al momento en que se realizó el análisis, se pudo observar que se encontraban correctamente embalados y preservados, por lo que no hubo la presencia de factores que pudieran alterar a la proteína como son: la deshidratación celular como consecuencia de la congelación intra y extra celular logrando de esta manera preservar a la proteína y además no se evidenció la presencia de actividad microbiana, alcanzando los resultados que se observan en el análisis garantía de un resultado positivo, lo que finalmente contribuye a la preservación de indicios que es el objetivo primordial que persiguen las autoridades judiciales para cualquier experticia en el campo forense y legal.

Es necesario señalar la enorme importancia que tiene el cumplir con los protocolos de recolección, embalaje y preservación de los indicios referentes a líquido seminal factor coadyuvante responsable de los resultados que se obtendrán en futuros análisis.

Tabla 4: Características del estado de conservación de los soportes sólidos en sus temperaturas de estudio

SOPORTES SÓLIDOS	ESTADO INICIAL EN EL QUE SE CONSERVARON LAS MUESTRAS		TEMPERATURA CONTROLADA		REFRIGERACIÓN		CONGELACIÓN	
	BUEN ESTADO	MAL ESTADO	BUEN ESTADO	MAL ESTADO	BUEN ESTADO	MAL ESTADO	BUEN ESTADO	MAL ESTADO
PRENDAS ÍNTIMAS FEMENINAS	11	3	2	3	0	3	0	
PRENDAS ÍNTIMAS MASCULINAS	6	2	1	2	0	1	0	
ALFOMBRA	2	1	0	0	1	0	0	
COLCHÓN	4	2	0	2	0	0	0	
PAPEL HIGIÉNICO	3	1	0	1	0	1	0	
GUANTES	2	1	0	0	0	1	0	
PRESERVATIVOS	7	4	0	2	0	1	0	
TOALLAS HIGIÉNICO	1	0	0	0	1	0	0	
HISOPADOS	11	4	0	5	0	2	0	
COBIJAS	1	0	0	1	0	0	0	
SÁBANAS	2	2	0	0	0	0	0	
TOTAL	50	20	3	16	2	9	0	
PORCENTAJE	100%	87%	13%	88%	11%	100%	0%	

FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once

Figura N° 12: Porcentaje del estado de conservación a temperatura controlada

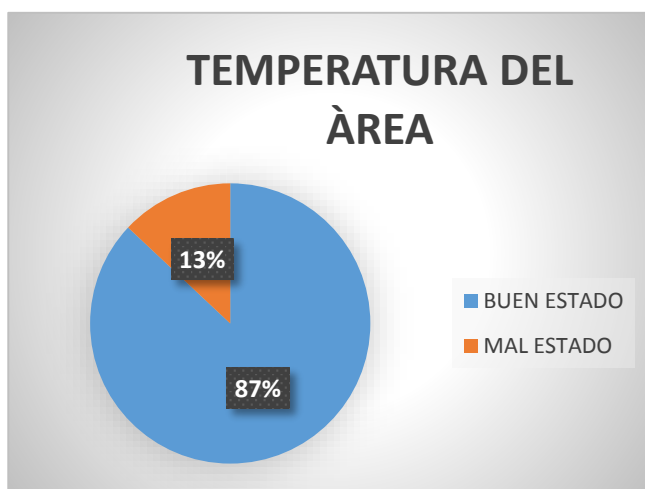
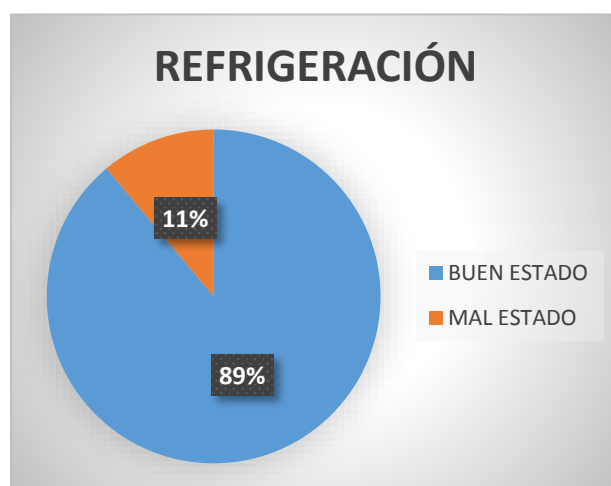


Figura N° 11: Porcentaje de estado de conservación a refrigeración



FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once

Figura N° 13: Porcentaje de estado de conservación en congelación



FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez, –Luis Eduardo Marquez, Once

Se analizó cincuenta diferentes soportes sólidos que previamente fueron preservados con fines investigativos y como respaldo judicial de la sentencia establecida en su debido momento, por lo que para su respectivo estudio se tomó en cuenta para su análisis el estado de conservación que obtuvieron las muestras durante cinco años.

A temperatura controlada se obtuvo 87% de muestras en buen estado entre las cuales tenemos: 3 prendas íntimas femeninas, 2 prendas íntimas masculinas, 1 de alfombra, 2 de colchón, 1 de papel higiénico, 1 de guantes, 4 de preservativos, 4 de hisopados y 2 de sabanas.

Un 13% de muestras se encontraban en mal estado, entre las cuales se encontraban 2 de prendas íntimas femeninas, y 1 de prendas íntimas masculinas.

En refrigeración se obtuvo el 88% de muestras en buen estado entre las cuales se describen: 3 prendas íntimas femeninas, 2 prendas íntimas masculinas, 2 de colchón, 1 de papel higiénico, 2 de preservativos, 5 de hisopados y 1 de cobijas,

Entre las muestras en mal estado que se encontraban en refrigeración se obtuvo un 11% entre las cuales son: 1 muestra de alfombra y 1 de toalla higiénica.

De las muestras analizadas en congelación los resultados obtenidos evidenciaron un 100% de muestras en buen estado en las que se describe 3 prendas íntimas femeninas, 1

prenda íntima masculina, 1 de papel higiénico, 1 de guante, 1 de preservativo y 2 hisopados.

Es necesario hacer hincapié en que las prendas íntimas a temperatura ambiente y refrigeración que no estuvieron bien conservadas y expuestas a humedad sufrieron un deterioro que originó la presencia de hongos, y es precisamente en estas muestras donde se encuentran los resultados negativos, a estos resultados negativos se suma la falta de conocimiento por parte por parte de todo el personal involucrado en la recolección, embalaje, transporte y conservación de los indicios que al momento de tomar el soporte en el que se presume contiene líquido seminal no permitió que secase a temperatura ambiente en el caso de muestras líquidas, hubo exceso de manipulación, no se utilizó guantes de nitrilo (los azules) que son los apropiados para el tratamiento de este tipo de muestras, no utilizaron guantes o embalaron en contenedores no adecuados para su transporte ocasionando alteración del indicio al no cumplir correctamente con la cadena de custodia, finalmente.

*Tabla 5 Comparación resultados en los diferentes soportes sólidos influidos por la temperatura y tiempo*

<b>TEMPERATURAS</b>	<b>P30 POSITIVO</b>	<b>P30 NEGATIVO</b>
ALMACENAMIENTO A LA TEMPERATURA DEL ÀREA	87%	13%
A REFRIGERACIÓN	89%	11%
A CONGELACIÓN	100%	0%

*FUENTE: Jeniffer Paola Sánchez Martínez –Luis Eduardo Marquez Once*

De los resultados de las cincuenta pruebas rápidas de cassette analizadas en las tres diferentes temperaturas mencionadas se refleja que la congelación es la temperatura más óptima para conservar soportes sólidos con P30 positivos ya que de las diferentes temperaturas analizadas en la de congelación se obtuvo un 100% de positividad, seguidamente la temperatura de refrigeración obteniendo un 89% de positividad y 11% negativo dentro de lo cual se debe tomar en cuenta que los soportes sólidos utilizados para el análisis no estuvieron embalados ni conservados de manera correcta pese que hace cinco años todas la placas de P30 salieron positivas.

En cuanto a la conservación de soportes sólidos a temperatura ambiente de la zona obtuvimos como resultado un 87% positivo y un 13% de negativo que al igual que en refrigeración los soportes sólidos estuvieron expuestos a humedad mal embalados y porque no se cumplió con los protocolos de conservación y embalaje; razón por lo que se originó hongos en las prendas interiores que es una de las causas de que esas prendas analizadas presentaran resultados negativos.

Dichas muestras han sido conservadas fines investigativos y por la posible reapertura de casos, además y por la falta de normas que establezcan el tiempo real que se deben conservar.

Estas muestras han sido conservadas durante cinco años atrás a diferentes temperaturas, como por ejemplo temperaturas controladas del sector, refrigeración y congelación con el propósito de confirmar resultados positivos en caso de reapertura de caso para verificar responsabilidades.

Se debe tomar en consideración todas las normas, medidas y recomendaciones necesarias para evitar la pérdida o alteración de las muestras.

En primer lugar tomando en cuenta que no existe la reglamentación necesaria en el COIP para la conservación de muestras de este tipo, y al no haber un tiempo límite establecido, lo que motiva a que los Institutos de Ciencias Forenses del nuestro país a buscar métodos de conservación óptimos y valederos que garanticen su preservación.

En segundo lugar se debe cumplir con las medidas de recolección, embalaje, transporte y almacenamiento, que finalmente son los que garantizarán un resultado confiable, al evitar la pérdida de muestra ya sea por una mala recolección, mal embalaje, o transporte.

Finalmente para la preservación de estas muestras es de vital importancia mantener la cadena de frío y no variar las temperaturas en las que en un principio fueron almacenadas, evitando que la muestra sufra y la posible desnaturalización de las muestras como resultado de la deshidratación celular.

Al preservar las diferentes muestras en congelación específicamente a (-18, -20 y -27 °C.), se logra congelar la solución acuosa intra y extra celular evitando la deshidratación y reduciendo de esta manera los procesos del metabolismo y la actividad microbiana logrando así de esta manera preservar la proteína, propósito de nuestra investigación. A



esta temperatura los resultados obtenidos fueron de un 100% de positividad, con lo cual confirmamos que la proteína está presente en las muestras analizadas a esta temperatura y demostrando que aunque hayan pasado 5 años se puede afirmar con un 100% de veracidad que a esta temperatura, en una posible reapertura de caso y un nuevo análisis de estas muestras obtendremos un resultado positivo.

En las muestras conservadas en refrigeración (-4, -5, -6, -7 °C.), se obtuvo un 89 % de positividad y 11 % de resultados negativos sin embargo estos resultados negativos no son concluyentes en consecuencia a la presencia de otro factor como la presencia de hongos que pudieron interferir con el análisis arrojando estos resultados, sin embargo se debe recalcar que el análisis de las muestras a esta temperatura donde no hubo la presencia de hongos los resultados arrojaron un 100% de positividad, validando el correcto embalaje y preservación de la proteína a esta temperatura.

Las muestras analizadas en este proyecto conservadas en temperatura ambiente fueron conservadas y almacenadas a las temperaturas ambientales de Riobamba aproximadamente entre 13°C. a 14°C. Y Ambato entre 14°C. a 15°C. y otra a 20°C. en la bodega del instituto de ciencias forenses.

Con mucha similitud a las muestras analizadas en la temperatura anterior la interferencia de hongos en los soportes analizados y específicamente en los que arrojaron resultados negativos fueron un factor de gran importancia como consecuencia de estos resultados, si se toma a consideración que todas las muestras analizadas en las que no hubo la presencia de este agente microbiano nos presentaron resultados positivos en un 100% confirmando así de esta manera que la proteína P30 se conserva a esta temperatura aún los cinco años.

Con los resultados obtenidos se confirma que el tiempo considerado para este estudio (cinco años) y las diferentes temperaturas analizadas, donde no hubo interferencia de otros factores como en este caso fueron los hongos los resultados confirmaron un 100% de positividad, estableciendo que la proteína P30 permanece inalterable bajo estas condiciones pudiendo validar, confirmar o verificar la responsabilidad del agresor del hecho delictivo pasado imposibilitando la evasión de culpas y confirmando sentencias.

## CONCLUSIONES:

- Los soportes sólidos fueron caracterizados en función de la textura, color, forma, consistencia, con la finalidad de confirmar que el soporte sólido sea el mismo descrito en la cadena de custodia y de reafirmar o confirmar culpabilidades, al igual que se pudo determinar un cambio de color del semen de grisáceo a amarillento en los cinco años de estudio.
- La proteína P30 fue determinada mediante la técnica inmunocromatográfica de cincuenta soportes sólidos diferentes preservados por un tiempo de cinco años a temperaturas de refrigeración de congelación y temperatura ambiente teniendo como resultado que la congelación es la temperatura más óptima para conservar soportes sólidos con P30 positivos ya que de las diferentes temperaturas analizadas en la de congelación se obtuvo un 100% de positividad, seguidamente la temperatura de refrigeración obteniendo un 89% de positividad y 11% negativo dentro de lo cual se debe tomar en cuenta que los soportes sólidos utilizados para el análisis no estuvieron embalados ni conservados de manera correcta pese que hace cinco años todas las placas de P30 salieron positivas. En cuanto a la conservación de soportes sólidos a temperatura ambiente obtuvimos como resultado un 87% positivo y un 13% de negativo que al igual que en refrigeración los soportes sólidos estuvieron expuestos a humedad mal embalados y porque no se cumplió con los protocolos de conservación y embalaje.
- Se realizó una comparación de los resultados de los diferentes soportes sólidos analizados hace cinco años a las temperaturas de temperatura ambiente, refrigeración y congelación donde se obtuvo un 100% de positividad de las muestras en las tres temperaturas analizadas congelación refrigeración y temperatura ambiente donde se estudió los mismos soportes sólidos encontrando el 89% de positividad en los soportes que fueron conservados en refrigeración el 87% de positividad de soportes que fueron conservados en temperatura ambiente y un 100% en congelación considerando que el soporte sólido del guante de vinilo y algunas prendas íntimas estuvieron mal embaladas

y guardadas lo que origino hongos y que dichos soportes sólidos mencionados dieran P30 negativo.

### **RECOMENDACIONES:**

- Confirmar que los soportes sólidos a analizar por los investigadores en cualquier experticia forense coincidan con los descritos en la cadena de custodia inicial, tomar en cuenta que el cambio de color de la zona donde se encuentra el líquido seminal cambia de color grisáceo a amarillento, observar cualquier rastro de alteración en el soporte y reportarlo antes de su análisis.
- Cumplir con los protocolos de conservación y embalaje evitando que los indicios estén expuestos a humedad o a otros factores que puedan contaminar y generar la proliferación de hongos, en caso que se tome un indicio húmedo dejarlo secar previamente a temperatura ambiente
- Conservar en congelación los indicios puesto que es la temperatura más óptima para preservar la proteína P30 y asegurarse de mantener la cadena de frío hasta su análisis pericial.


## BIBLIOGRAFÍA

1. Cáceres V. Del tiempo de conservación de las muestras biológicas forenses en el campo legal. [Online].; 2017 [cited 2018 Febrero 19. Available from: <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/5978/1/PIUAAB016-2017.pdf>.
2. Quezada C. Principio de intercambio de Locard. [Online]. Barcelona: MAXTOR; 2014 [cited 2018 Febrero 28. Available from: [http://www.reydes.com/d/?q=Principio\\_de\\_Intercambio\\_de\\_Locard](http://www.reydes.com/d/?q=Principio_de_Intercambio_de_Locard).
3. Guillén L. Estructura Y Propiedades De Las Proteínas. [Online].; 2017 [cited 2017 Noviembre 25. Available from: [https://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf).
4. Paz M. Manual de procedimientos del laboratorio de Inmunología. [Online].; 2011 [cited 2017 Noviembre 26. Available from: <https://microinmuno.files.wordpress.com/2012/07/manual-de-inmunologia.pdf>.
5. Organización Mundial De la Salud. Violencia Sexual. [Online].; 2011 [cited 2017 Noviembre 18. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98821/1/WHO\\_RHR\\_12.37\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98821/1/WHO_RHR_12.37_spa.pdf).
6. Del Pozo B. Código Orgánico Integral Penal. Registro Oficial Órgano del Gobierno del Ecuador. 2014 Febrero; 1(180).
7. Rozo , Malaver M. La Mujer Como Sujeto Especial De Protección En Las Políticas. [Online].; 2014 [cited 2017 NOVIEMBRE 25. Available from: <http://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/2037/1/Monograf%C3%ADa%20Trabajo%20de%20Grado%20ICJ-UCC-%20Mar%C3%ADa%20Fernanda%20Rozo%20Malaver%202015.pdf>.
8. Tortora G, Derrickson B. Principios De Anatomía Y Fisiología. 13th ed. PANAMERICANA , editor. BUENOS AIRES: PANAMERICANA; 2013.
9. Quispe M. Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. [Online].; 2010 [cited 2018 febrero 19. Available from: [http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v18n2/a11\\_v18n2.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v18n2/a11_v18n2.pdf).
10. Arcila J. La bioquímica del antígeno específico de. [Online].; 2008 [cited 2018 febrero 19. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl083-4d.pdf>.
11. Dickerman K , Castro D. Sexología Forense. [Online].; 2010 [cited 2017 Noviembre 20. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/SexologiaForense/pdf/SexologiaForense-10.pdf>.
12. Estado, Fiscalía General del. Manual de Procedimiento de laboratorio de Biología forense. [Online]. [cited 2017 Noviembre 20. Available from: [http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Area%20Ciencias%20Forenses/6\\_\\_Manual\\_de\\_Procedimientos\\_de\\_laboratorio\\_de\\_Biologa\\_Forense.pdf](http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Area%20Ciencias%20Forenses/6__Manual_de_Procedimientos_de_laboratorio_de_Biologa_Forense.pdf).

13. Avedaño U. Guía de medico Legal. [Online].; 2012 [cited 2017 Noviembre 20. Available from:  
[http://www.mpfm.gob.pe/escuela/contenido/actividades/docs/2231\\_12\\_guia\\_ev\\_de\\_integridad\\_sexul\\_ogc.pdf](http://www.mpfm.gob.pe/escuela/contenido/actividades/docs/2231_12_guia_ev_de_integridad_sexul_ogc.pdf).
14. Cortes I, Garibay R. Temperatura. [Online]. [cited 2018 Enero 30. Available from:  
<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Apuntes%20para%20la%20asignatura%20de%20instrumentaci%C3%B3n%20y%20control/cap2.pdf>.
15. Montoya S. Efecto Ambientales en los composites temperatura y humedad. [Online].; 2009 [cited 2018 Enero 30. Available from: <https://www.significados.com/temperatura/>.
16. Pérez J, Merino M. Definición de refrigeración - Qué es, Significado y Concepto. [Online].; 2009 [cited 2018 Enero 30. Available from: <https://definicion.de/refrigeracion/>.
17. Bordo G. Guia Sanitaria. [Online]. [cited 2018 Enero 30. Available from: [http://www.seg-social.es/ism/gsanitaria\\_es/ilustr\\_capitulo14/cap14\\_4b\\_higalimentos.htm](http://www.seg-social.es/ism/gsanitaria_es/ilustr_capitulo14/cap14_4b_higalimentos.htm).
18. Barreno J. Manejo y tipos de indiciospercederos en la escena del crimen tesis de grado. [Online].; 2013 [cited 2018 Febrero 22. Available from:  
<http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2013/07/03/Barreno-Geovanny.pdf>.
19. Michelis A. Congelación de frutas, hortalizas, hongos, carnes y mazas. [Online].; 2009 [cited 2018 febrero 19. Available from: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_cartilla\\_congelacion.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_cartilla_congelacion.pdf).
20. Benitez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de Proteína procesos y aplicaciones. [Online].; 2014 [cited 2018 Febrero 22. Available from:  
<http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>.
21. ABACard p30 Test For The Forensic Identification of Semen. 2017. Inserto de la Técnica de diagnóstico in vitro de proteina p30 catálogo No. 308332.
22. Fiscalía General del Estado. Manuales Protocolos Instructivos Medicina Legal y Ciencias Forenses. [Online].; 2014 [cited 2018 Febrero 22. Available from:  
[http://eempn.gob.ec/documentos\\_2017/FGE-Manual.pdf](http://eempn.gob.ec/documentos_2017/FGE-Manual.pdf).
23. Forneriro. Manual de ciencias Forenses. In Castelo , editor.. Madrid: Aran; 2007.
24. Cortez A, Logroño L. Estudio comparativo entre la determinacion de PSA total y P30 para la valoracion de liquido seminal en casos forenses durante el periodo Octubre 2015-Marzo 2016 en el centro de investigacion de ciencias forenses de la ciudad dela Ciudad de Ambato. [Online].; 2016 [cited 2018 Febrero 01. Available from:  
<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1994/1/UNACH-EC-LAB-CLIN-2016-0015.pdf>.
25. Enciclopedia Britannica. Proteína - Desnaturalización de Proteínas. [Online].; 2018 [cited 2018 Enero 29. Available from: <https://www.britannica.com/science/protein/Protein-denaturation>.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Inserto de la Técnica de Determinación de P30

 Abacus Diagnostics, Inc.

### ABAcad® p30 Test For The Forensic Identification of Semen

*For Forensic Use*

**Immunoassay for the qualitative detection of p30 for the forensic identification of semen.**

Catalog # 308332 (25 Test/kit)

#### Technical Information sheet Intended Use

ABAcad® p30 test is designed to qualitatively detect p30 for the forensic identification of semen. p30 is an accepted marker for detecting semen in criminal cases including vasectomized or azoospermic individuals.

#### Summary

In 1971 Hara et al. first described a protein in the seminal fluid, named gamma-seminoprotein. In 1978, Sensabaugh et al. characterized the protein in detail, found that its molecular weight corresponds to 30,000 Dalton and named it p30. In 1980 first immunometric assays were developed and Graves and Sensabaugh demonstrated that p30 is a reliable forensic marker for the identification of semen. The range of p30 is 200,000 to 5.5 million nanogram per ml of semen. The sensitivity of ABAcad, p30 test is 4 ng/ml and therefore seminal fluid diluted up to 1 in a million should also be detectable. Various methods of detection of p30 include Ouchterlony double diffusion, crossover electrophoresis, rocket immunoelectrophoresis, radial immunodiffusion, and ELISA. A disadvantage of all the above conventional methods is that they are either not sensitive enough or cumbersome and time consuming to perform in forensic laboratories. Abacus Diagnostics's ABAcad® p30 is, however, very sensitive with results only within 10 minutes.

#### Principle Behind This Test

In this test procedure, 200 µl of sample is added to the sample well 'S', and allowed to soak in. If p30 is present in the semen specimen, it will react with the mobile monoclonal antihuman p30 antibody and a mobile antigen antibody complex is thus formed. This mobile antibody-antigen complex migrates through the absorbent device towards the test area 'T'. In the test area 'T', a monoclonal antihuman p30 antibody is immobilized. This immobilized antibody captures the above complex so that an antibody-antigen-antibody sandwich is formed. The conjugated pink dye particles concentrate in a narrow zone on the membrane. When the p30 concentration in the sample exceeds 4 ng/ml the pink dye particles will form a pink colored band in the test area 'T' indicating a positive test result. As an internal positive control, p30 antibody-dye conjugates cannot bind to the antibody in the test area 'T', but are captured by an immobilized anti immunoglobulin antibody present in the control area 'C' forming a complex. The captured pink dye particles will thus form a band in the control area 'C', indicating that the test has worked properly and proper procedures have been followed. Thus, presence of two colored lines, one in the test area 'T' and other in the control area 'C', indicates a positive result, while a line only in the control area 'C' would indicate a negative result (provided no "high dose hook effect").

#### Reagents And Materials Provided

1. Test Device (25 pcs, each sealed individually in a test pouch)
2. A Dropper and a desiccant sealed inside each of the test pouch.
3. Extraction Buffer

#### Materials Required But Not Included

1. Clock or timer.
2. Centrifuge

#### Stability, Storage and Shelf Life

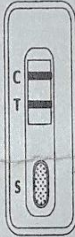
ABAcad® p30 Detection Test should be stored below 82°F (28°C). The test can be stored in the sealed pouch below 82°F (28°C) until the expiration date as printed on the sealed test pouch. Do not Freeze. Do not use the test after the expiration date.

#### Sample Collection, Preparation and Storage

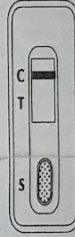
- The frozen specimens/swabs/stains must be thawed completely and brought to 2-8 °C.
- Extraction of specimens from swab or stain may be performed in 750 µL of Extraction Buffer for 2 hours at 2-8 °C. This procedure recovers approximately 99% of the extractable p30 on the swab.
- Centrifuge the above sample for 3 minutes after the above extraction step. Remove 300 µl of supernatant for testing purposes. This aliquot may be stored between 2-8 °C if not used immediately. Immediately before use with ABAcad® p30 test, the sample should be brought back to room temperature. Remaining sample may be used for further DNA analysis without affecting the DNA yield.

#### Test Protocol

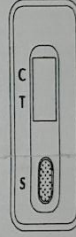
1. Allow the sample to warm to room temperature if it has been refrigerated.
2. Remove the device and the dropper from the sealed pouch.
3. Label the device with the case number.
4. Add 200 µL (or 6-7 drops with the dropper) of sample to the sample well 'S' of the test device.
5. Read result at 10 minutes. Positive results can be seen as early as 1 minute depending upon the p30 concentration. For negative results, one must wait for full 10 minutes.



Positive



Negative



Invalid

1. **Positive.** If there are two pink lines, one each in the test area 'T' and in the control area 'C', the test result is positive and indicates that the p30 level is at or above 4 ng/ml.
2. **Negative.** If there is only one pink line (in the control area 'C'), the test result is Negative. This may indicate that (a) No p30 is present above 4 ng/ml or (b) Presence of "High Dose Hook Effect". Presence of "High Dose Hook Effect" may give false negative result due to the presence of high concentration of p30 in the sample, as for example in undiluted seminal fluid. In such cases the sample may be retested using a 10 to 10,000 fold dilution.
3. **Invalid.** If there is no pink line visible in the control area 'C', the test is inconclusive. Repeat the test and reexamine the test procedure carefully.

#### PRECAUTIONS

- For the in vitro qualitative detection of p30 for the forensic identification of semen only.
- Do not use beyond the expiration date which appears on the kit components.
- Disposable gloves should be worn while handling kit reagents or specimens. Wash your hands after the test.
- A fresh transfer pipette for each specimen should be used.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are being handled.

- Handle all forensic samples as if they were capable of transmitting disease. Follow standard procedures for proper disposal of specimens.
- Kit reagents contain sodium azide as a preservative which may react with lead or copper in plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal, always flush with large volumes of water to prevent build up in drains.

### Quality Control

The control line in the control area 'C' can be considered an internal procedural control. A distinct pinkish line will always appear if the test has been performed correctly. If the control line 'C' does not appear, the test is invalid and a new test should be performed following the correct test procedure. A quality control test using positive and negative control standards may also be performed.

### Limitations

1. ABACard<sub>®</sub> p30 Test is only for in vitro detection of p30 for the forensic identification of semen. Not for clinical diagnostic use, for research use only.
2. The test must be performed in strict accordance with these instructions to obtain accurate and reproducible results.
3. If elevated p30 levels is suspected but a negative result is obtained, the test should be repeated and with fresh specimen.
4. Test results should be interpreted in conjunction with other test results and available information.
5. Positive results may be obtained with male urine, which has a reported p30 mean value of 260 ng/ml. Seminal vesicle specific antigen should not be present when tested with urine. Use of another appropriate test is recommended when male urine is in question. Acidic, Neat or viscous test samples may cause false positive or invalid test results.
6. Appropriate specimen should be used since p30 is detectable in the vaginal tract only up to a maximum of 2 days.

### Performance Characteristics

#### Sensitivity

The minimum detection limit of ABACard<sub>®</sub> p30 Test is 4 ng/ml in 10 minutes (using Stanford's seminal plasma derived Standard, Catalog # L-F500, Phone # (650)721-6472 or (650) 255-5154 and using buffer in this kit). Results with specimens having high levels of p30 may be obtained as early as 1 minute. For negative results, one must wait for full 10 minutes. The range of p30 is 200,000 to 5.5 million nanograms/ml of semen. Therefore, depending on p30 concentration, seminal fluid diluted up to 1 in a million may also be detectable.

#### Specificity

Hemoglobin (10 g/L), bilirubin (100 mg/L) and lipemic samples, as indicated by triglyceride (5 g/L), do not interfere with the test results. High protein concentration such as prostatic acid phosphatase (1000 ng/ml), albumin (20 g/L), chorionic gonadotropin (900 IU/ml), transferrin (5 g/L) and prolactin (1 mg/L) did not interfere with test results. Besides semen from both normal and vasectomized men, positive results were obtained from post-ejaculate urine and male urine from adult men, when the urine samples were directly added to the test. However, it is well established that p30 does occur in these urine samples with a reported mean value of 260 ng/ml. Seminal vesicle specific antigen should not be present when this test is used with urine.


### Intra Assay and Inter Assay Studies

#### Intra-assay

An Intra Assay variability study was performed. Ten replicates of known positive and negative p30 samples were tested. The results demonstrated a 100% agreement with the expected results.

#### Inter-assay

Independent assays were performed on the above samples with three lots of ABACard<sub>®</sub> p30 Test over a three month period. The assay results were 100% in agreement with the expected results.

Manufactured by:  **Abacus Diagnostics, Inc.**

Phone (877) 225-9900 [www.abacard.com](http://www.abacard.com)

### Some Frequently Asked Questions

Q1. What is "High Dose Hook Effect"?

A1. "High Dose Hook Effect" occurs when the p30 concentration is too high since ABACard<sub>®</sub> p30 test is very sensitive. The mechanism behind this effect is that huge amounts of human p30 bind both to the antibody to form an antigen-antibody complex but also free p30 migrates towards the test area "T". The antibody in the test area "T" is blocked by this free p30. Therefore the mobile antigen-antibody complex with the pink color cannot bind to the antibody. As a result no pink line will form in the test area "T" although a lot of p30 is present in the sample giving a false negative result.

Q2. Is there any minimum and maximum times for reading the results.

A2. Yes there is a maximum time of 10 minutes. The minimum time in a positive result is the time at which both lines appear. The time of the reaction depends upon p30 concentration and other characteristics of the specimen. However if the test line did not appear before ten minutes, one should wait for full 10 minutes to allow the reaction to occur. Specimen with lowest concentration of p30 should take longest time to react. It is to be noted that the results should not be read after 10 minutes since non specific reactions may occur and may result in false positives.

Q3. What does control band 'C' represent?

A3. The built-in procedural positive control is provided by the appearance of a pink line next to the letter 'C', validating the integrity of the test, assuring that the correct test procedure was followed and indicating that proper volume of the fluid entered the test cassette and capillary flow occurred. If the line in the control area 'C' does not develop within 10 minutes, the test result is invalid. Repeat the test using proper procedures.

Q4. Does the intensity of the test band 'T' and control band 'C' matter?

A4. The intensity of either the control band or the test band should not be compared between tests or to each other for ABACard<sub>®</sub> p30 Test and no quantitative interpretation should be made based upon differences in the intensity. The mere

appearance of both lines proves the presence of p30.

Q5. Where can we order the standard from?


A5. You may order L-F500 standard from Stanford by calling (650)721-6472 or (650) 255-5154.

### References

- (1) Benton, K.A., Donahue, J.A., Valadez, Jr., M. Analysis of the ABACard<sub>®</sub> p30 Test for use in the forensic laboratory. 1998.
- (2) Kuester, J., Rothenberg, D., Schwartz, E., Eustace, M., Adamo, R. Validation of a commercial p30 kit (ABACard<sub>®</sub>) for forensic identification of semen. 1998.
- (3) Carradine, C.C. Evaluation of ABACard<sub>®</sub> p30 test for the identification of Semen. 1998.
- (4) Kristaly, A., Smith, D.A.S. Validation of ABACard<sub>®</sub> p30 test for the rapid forensic identification of Semen. 1999.
- (5) Silenieks, E., Pearman, C., Atkinson, C. The Use of the ABACard<sub>®</sub> p30 Test for the Detection of p30 (PSA) in Seminal Stains and Swabs. 2004.
- (6) Sattler, E. A Timeline of Seminal Fluid Markers within the Arid Zone. Northern Territory Police, Crime Scene Examination Unit. 2005.
- (7) Stamey, T. et al. Reference reagents for prostate-specific antigen (PSA): Establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). *Clinical Chemistry*. V 46(9), p 1291-92, 2000.
- (8) Cartledge JJ et al. The stability of free and bound prostate-specific antigen. *BJU Int*, Nov;84(7):p 810-4, 1999.
- (9) Sokoll, L.J., Chan, D.W. p30. Its discovery and biochemical characteristics. *Urologic Clinics of North America*. v 24(2), p253-9, 1997.
- (10) Diamandis, E.P., Yu, He. Nonprostatic Sources of Prostate-Specific Antigen. *Urologic Clinics of North America*. v 24(2), p275-82, 1997.
- (11) Stamey, T.A. et al. Identity of p30 purified from seminal fluid by different methods: comparison by amino acid analysis and assigned extinction coefficients. *Prostate*. v 27(4), p 198-203, 1995.
- (12) Jimenez, Verdejo, A., Osuna, E. et al. Study of the enzymatic activity of GGT, LDH, PAP and p30 in semen stains: application to age calculation. *For. Sci. Int.* v 68(1), p 7-15, 1994.
- (13) Armbruster, D.A. p30: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clinical Chemistry*. V 39(2), p 181-95, 1993.
- (14) Stowell, L.I. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for p30. *For. Sci. Int.* v 50(1), p 125-38, 1991.
- (15) Engelmann, U.H., Schramek, P., Tomamichel, G., Deindl, F., Senge, T.H. Vasectomy reversal in central Europe: results of a questionnaire of urologists in Austria, Germany and Switzerland. *J. Urol.* v 143(1), p 64-67, 1990.
- (16) Graves, H.C.B. et al. Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *New Engl. J. Med.* v 312 (6), p 338-343, 1985.
- (17) Willot, G.M. Frequency of azoospermia. *For. Sci. Int.* v 20(1), p 9-10, 1982.
- (18) Sensabaugh, G.F. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J. Forensic Sci.* v 23 (1), p 106-115, 1978.

© Copyright  
Printed in USA Rev 09/2017  
ABACard<sub>®</sub> p30  
Catalog No. 308332

## ANEXO 2. CERTIFICADO DE CALIDAD DE LA PIPETA VARIABLE DE 100 A 1000 µl. SUMIDEX



# SUMEDIX

QUALITY CONTROL CERTIFICATE  
 QUALITÄTSKONTROLLZERTIFIKAT  
 CERTIFICAT DE CONTRÔLE/QUALITÉ  
 CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD  
 CERTIFICATO DI CONTROLLO QUALITÀ

*All Digital Micropipettes are warranted to be free from defects in material and workmanship for a period of 3 years from the date of purchase. Your product will be duly repaired upon prompt notification in compliance with the following conditions:*

*Defects or damages caused by physical and/or chemical abuse or normal wear and tear or resulting from the Micropipette being used in any manner other than as instructed in the manual are not covered by the warranty. The warranty is invalidated by non factory modification, which will immediately terminate all liabilities on the manufacturer for the product or damages caused by its use.*

*The buyer shall be responsible for the product or use of products as well as any supervision required for safety. Routine cleaning and recalibration are not covered under the terms of warranty.*

*If requested the product must be returned to the local distributor in well packed and insured manner. All shipping charges must be paid.*

**Digital Micropipettes fulfil following International Standards:**

International Organization for Standardisation	ISO 8655, part 1-6
European Committee for Standardisation	CEN EN ISO 8655
German Institute for Standardisation	DIN 12650
Electrical and general safety requirements	IEC 61010-1
Electromagnetic compatibility requirements	IEC 61326-1
Marking and layout in accordance with	IEC 60073
Conformity testing in accordance with	DIN 12600

### CALIBRATION REPORT

Report No : 536081	Report Date : 29-Jul-2013
Prod Cat. No : VAP-600	PipetteSerial No.: IG459825
Volume Range : 100-1000 µl	Bal Sensitivity : 0.01 mg
Temperature : 24.50 °C	Rel Humidity : 59.00 %
Air Pressure : 1013 hPA	Z Factor : 1.0039 µl/mg

#### TEST DETAILS

Test Volume	Number of Measurements	Mean Weight	Mean Volume
100.00 µl	10	100.1220 mg	100.5125 µl
500.00 µl	10	500.4600 mg	502.4118 µl
1000.00 µl	10	997.0670 mg	1000.9556 µl

#### SUMMARY STATISTICS

Test Volume	SD	Inaccuracy E%			Imprecision CV%		
		Actual	Target	Status	Actual	Target	Status
100.00 µl	0.2624	0.5125	± 2.00	PASS	0.2611	± 0.70	PASS
500.00 µl	0.8029	0.4824	± 1.00	PASS	0.1598	± 0.40	PASS
1000.00 µl	0.9543	0.0956	± 0.60	PASS	0.0953	± 0.20	PASS

<b>STATUS :</b>	PASSED	Calibration Method according to ..... EN ISO 8655-6 Performed by ..... Incharge - Q.C.
-----------------	--------	---

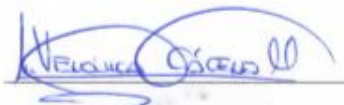
Calibration In-charge : Mr. Mittal Shah



**ANEXO 3. CERTIFICADO DE PRESERVACIÓN DE LOS SOPORTES  
SÓLIDOS UTILIZADOS PARA LA INVESTIGACIÓN**

**CERTIFICADO**

Yo MsC. Verónica Paulina Cáceres Manzano con número de cedula 060408976-3 certifico que los soportes solidos utilizados por el análisis del proyecto **“Influencia de la temperatura y el tiempo en la preservación de la Proteína P30 en soportes sólidos”** realizado por los estudiantes Jeniffer Paola Sánchez Martínez y Luis Eduardo Marquez Once fueron muestras preservadas con fines de investigación hace cinco años atrás en el Instituto de Investigación y Ciencias Forenses en la Ciudad de Ambato.



MsC. VERÓNICA CÁCERES  
**TUTORA DEL PROYECTO**

#### **Anexo 4. GUÍA DE OBSERVACIÓN**

1. Verificar la cantidad exacta de muestras en las que se realizará el análisis forense.
2. Identificar el numérico exacto de los soportes donde se encuentran las muestras de líquido seminal de acuerdo a la temperatura de conservación.
3. Caracterizar los soportes de acuerdo a su actual estado de conservación para identificar alteraciones significativas que puedan influenciar en los resultados.
4. Instruirse y ejercitarse en la técnica de extracción de muestras de acuerdo al procedimiento establecido por la Fiscalía General del Estado.
5. Realizar una praxis sistemática con el fin de formar la destreza necesaria para la realización de la técnica de recuperación de la proteína que se desea analizar.
6. Rotular los soportes, los tubos ependorf y los cassettes para su identificación.
7. Realizar la técnica de recuperación de la proteína P30.
8. Ejecutar la técnica inmunocromatográfica de acuerdo al inserto.
9. Observar el resultado y realizar las estadísticas necesarias.

## Anexo 5. FOTOS DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA



Imagen N 1: Calibración de la pipeta

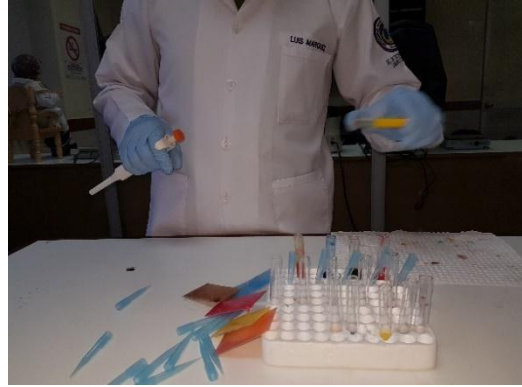


Imagen N 2: Calibración de la pipeta



Imagen N 3: Resultados de la calibración

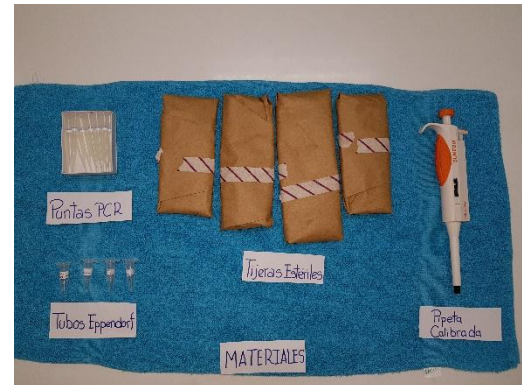


Imagen N 4: Materiales utilizados

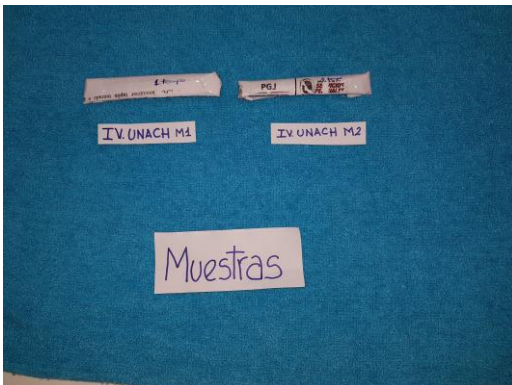


Imagen N 5: Muestras de prendas íntimas en hisopados



Imagen N 6: Cassettes de identificación de p30



Imagen N 7: Buffer para la recuperación de p30



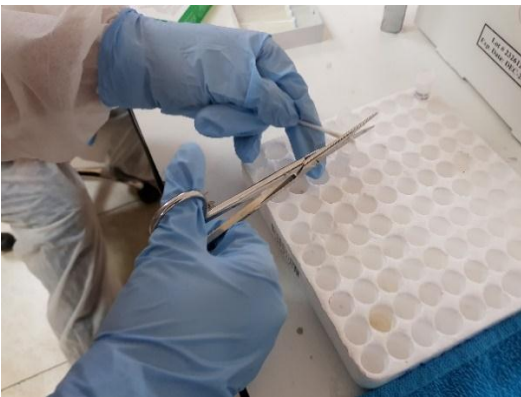
Imagen N 8: Muestra conservada en guantes



*Imagen N 9: Muestra conservada en hisopos y papel higiénico*



*Imagen N 10: Tijeras estériles*



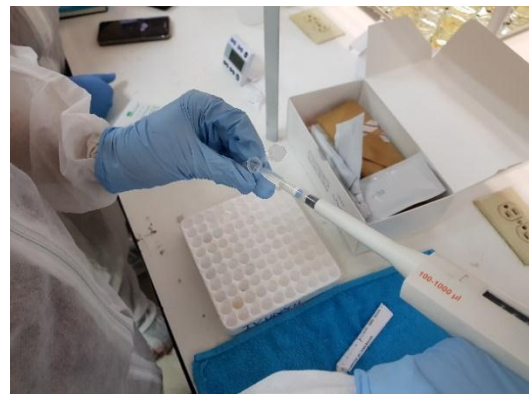
*Imagen N 11: corte longitudinal del hisopo con muestra*



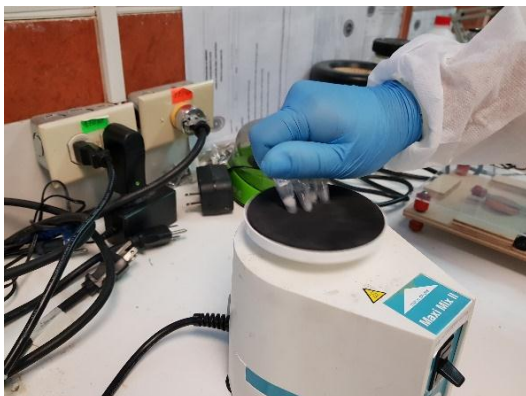
*Imagen N 12: colocación en los tubos ependorf*



*Imagen N 13: Buffer para la recuperación de P30*



*Imagen N 14: Colocación del buffer en el tubo*



*Imagen N 15: Técnica de vortexeo durante 1'*



*Imagen N 16: refrigeración pos vortexeo durante 10'*

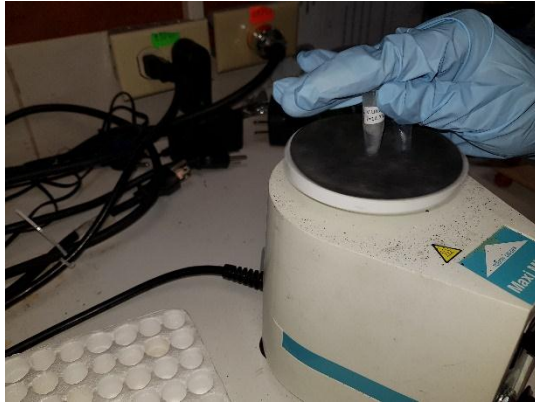


Imagen N 17: técnica que se repite cada 10 por 2 horas



Imagen N 18: La refrigeración se repite luego de cada vortexeo

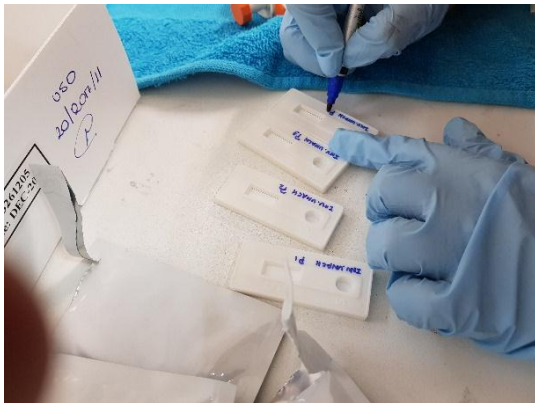


Imagen N 19: Rotulación de los cassettes de P30 cassette



Imagen N 20: Adición de 200 ul o 6 a 7 gotas en el

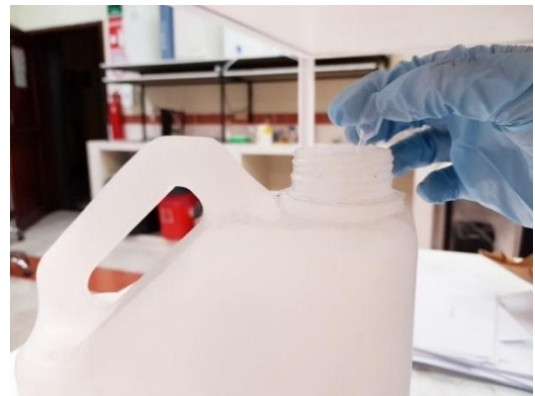


Imagen N 21: Eliminación de los desechos



Imagen N 22: lectura posterior a los diez minutos

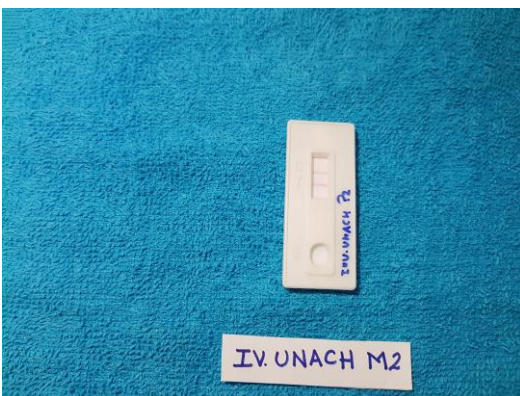


Imagen N 23: Resultado positivo

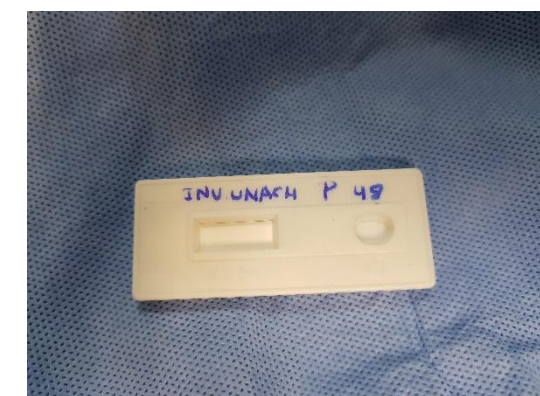


Imagen N 24: Resultado negativo