

**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

Título del proyecto

**EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DEPENDIENTES PARA EL  
ANÁLISIS FORENSE EN SOPORTES SÓLIDOS EN LA  
VALIDACIÓN DE DELITOS SEXUALES**

Autores:

**LUIS FERNANDO CHÁVEZ VERA  
NATHALY KASSANDRA MOSCOSO MORENO**

Tutor:

Dr. Wilson Moncayo.

Riobamba, Ecuador

2018

## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Evaluación de técnicas dependientes para análisis forense en soportes sólidos en la validación de delitos sexuales” presentado por: Luis Fernando Chávez Vera, y dirigido por Dr. Wilson Edwin Moncayo Molina, 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 los expuesto firman:

Dra. Patricia Miño

**Presidente del Tribunal**



**FIRMA**

Mgs. Mercedes Balladares

**Miembro del Tribunal**



**FIRMA**

Mgs. Felix Falconi

**Miembro del Tribunal**



**FIRMA**

## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Evaluación de técnicas dependientes para análisis forense en soportes sólidos en la validación de delitos sexuales” presentado por: Nathaly Kassndra Moscoso Moreno, y dirigido por Dr. Wilson Edwin Moncayo Molina, 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 los expuesto firman:

Dra. Patricia Miño

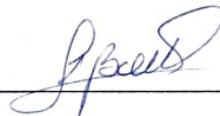
**Presidente del Tribunal**



**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 **LUIS FERNANDO CHÁVEZ VERA** y **NATHALY KASSANDRA MOSCOSO MORENO** para optar al títulos de Licenciados en Laboratorio Clínico e Histopatológicos y que acepto asesorar a los estudiantes en calidad de tutor, a los ejecutores de la investigación durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping, fluid strokes that form a complex, somewhat abstract shape. The signature is positioned above the printed name of the tutor.

Dr. Wilson Moncayo Molina

**AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN:**

**“LA RESPONSABILIDAD DEL CONTENIDO DE ESTE PROYECTO DE GRADUACIÓN, NOS CORRESPONDE EXCLUSIVAMENTE A: LUIS FERNANDO CHÁVEZ VERA Y NATHALY KASSANDRA MOSCOSO MORENO, Y DIRIGIDA POR: DR. WILSON EDWIN MONCAYO MOLINA; Y EL PATRIMONIO INTELECTUAL DE LA MISMA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO.”**



Luis Fernando Chávez Vera  
CI. 060406082-2



Nathaly Kassandra Moscoso Moreno  
CI. 060410622-9

## **AGRADECIMIENTO**

Presentamos nuestro rotundo agradecimiento al establecimiento que nos abrió las puertas, a la Universidad Nacional de Chimborazo distinguida institución caracterizada por formar profesionales de excelencia, misma que fue testigo de todos nuestros esfuerzos y desvelos en cada nivel aprobado de nuestra carrera, nuestra eterna gratitud a todos los distinguidos docentes que con su alto conocimiento nos ha brindado su doctrina para nuestra formación moral y académica, a nuestra apreciada directora de escuela, Dr. Patricio Mino, por ser un pilar fundamental para la culminación de cada peldaño en titulación, y a nuestro distinguido tutor, Dr. Wilson Moncayo por encaminarnos en la realización de este trabajo, y a nuestra muy querida Lic. Verónica Cáceres por ser nuestra mentora en la realización del presente trabajo, por brindarnos su amplio conocimiento del área forense, por compartirnos su calidad humana y por guiarnos en la culminación de la presente investigación.

*Luis Fernando Chávez Vera y Nathaly  
Kassandra Moscoso Moreno*

## **DEDICATORIA**

Con mucho afecto agradezco este nuevo logro a mis padres, por ser el apoyo fundamental para la culminación de mi carrera, también quiero agradecer a mi pareja, Paola, quien fue mi compañera de desvelos, risas, estudio y triunfos en el transcurso de mi carrera y también a mi pequeño retoño, ese ser angelical que forma parte de mí, quien me ha dado una rotunda felicidad a mi vida y es por quien tengo más fuerzas para seguir poniéndome retos de superación personal.

*Luis Fernando Chávez Vera*

## **DEDICATORIA**

Al culminar este importante peldaño en mi vida quiero agradecer mis padres, por apoyarme en todo este camino que hemos recorrido, siempre confiaron en mí y nunca dejaron de creer en mí, a mi hermano por ser el que ha estado a mi lado durante los momentos buenos y malo y siempre me ha ayudado cuando más lo he necesitado. A mi familia le debo este nuevo logro en mi vida.

*Nathaly   Kassandra   Moscoso  
Moreno*

## INDICE

RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	4
General.....	4
Específicos.....	4
ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA.....	5
EL LÍQUIDO SEMINAL.....	5
EL SEMEN COMO EVIDENCIA.....	7
ASPECTOS RELEVANTES EN LA TOMA DE MUESTRA DEL SEMEN.....	7
IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA P30 EN DELITOS SEXUALES.....	8
Determinación P30.....	8
Muestra requerida.....	9
Interpretación de resultados.....	9
TINCIÓN CHRISTMAS TREE PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	10
Muestra requerida.....	11
Principio.....	11
Preparación de Reactivos.....	11
Observación.....	12
Limitaciones.....	12
ASPECTOS LEGALES EN RELACIÓN A DELITOS CONTRA LA INTEGRIDAD SEXUAL Y REPRODUCTIVA.....	12
METODOLOGÍA.....	13
Tipos de investigación:.....	13
Diseño de la Investigación:.....	13
Método de Investigación:.....	14
Tipo de estudio:.....	14
Población y muestra.....	14
Técnicas e Instrumentos de recolección de Datos:.....	14

Procedimientos para la obtención de muestra sobre un soporte sólido y determinación de P30.....	14
Procedimiento para coloración Christmas Tree.....	15
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>16</b>
MUESTRAS ANALIZADAS DE PROTEÍNA P30.....	19
Control de calidad de las cacetitas de p30.....	20
MUESTRAS ANALIZADAS CON TÉCNICA DE TINCIÓN CHRISTMAS TREEE	20
Control de calidad de los colorantes .....	23
CONTRASTE DE RESULTADO DE P30 CON CHRISTMAS TREE.....	24
Proceso de secado de muestras posterior a su análisis.....	25
Factores que degrada la muestra .....	25
Protocolo de procesamiento de evidencias.....	25
Conservación de las muestras .....	26
Temperatura y humedad.....	26
Cadena de frío para el traslado de indicios .....	27
CONCLUSIONES.....	28
RECOMENDACIONES .....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	30
<b>ANEXOS</b> .....	<b>32</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Componentes del líquido seminal .....	6
<b>Tabla 2:</b> Tiempo de vida de los espermatozoides según el lugar del cuerpo en que fueron depositados. ....	6
<b>Tabla 3:</b> Preparación de reactivo 1 de la tinción Christsmas Tree.....	11
<b>Tabla 4:</b> Preparación de reactivo 1 de la tinción Christsmas Tree.....	11
<b>Tabla 5:</b> Total de muestras analizadas de proteína P30.....	17
<b>Tabla 6:</b> Total de muestras analizadas con tinción Christmas Tree .....	18
<b>Tabla 7:</b> Total de muestras analizadas con técnica P30 .....	19
<b>Tabla 8:</b> Total de muestras analizadas con tinción Christmas Tree .....	20
<b>Tabla 9:</b> Comparación de resultado de proteína P30 y tinción Christmas Tree .....	24

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfica 1:</b> Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad.....	17
<b>Gráfica 2:</b> Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad.....	17
<b>Gráfica 3:</b> Muestras conservadas a 4 °C y 55% de humedad.....	17
<b>Gráfica 4:</b> Muestras conservadas a -5 °C y 85% de humedad.....	17
<b>Gráfica 5:</b> Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad.....	18
<b>Gráfica 6:</b> Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad.....	18
<b>Gráfica 7:</b> Muestras conservadas a 4°C y 55% de humedad.....	18
<b>Gráfica 8:</b> Muestras conservadas a -5°C y 85% de humedad .....	18
<b>Gráfica 9:</b> Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad.....	21
<b>Gráfica 10:</b> Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad.....	21
<b>Gráfica 11:</b> Muestras conservadas a 4°C y 55% de humedad.....	22
<b>Gráfica 12:</b> Muestras conservadas a -5°C y 85% de humedad.....	23

## RESUMEN

Los delitos sexuales han incrementado alarmantemente durante los últimos 5 años, por lo tanto, la recolección de indicios, análisis de evidencias y reporte de resultados dentro del laboratorio forense es esencial para la resolución de casos de delitos sexuales. Las técnicas para evidenciar la existencia de un delito sexual son determinación de P30 y técnica de coloración Christmas Tree, ambas técnicas son dependientes y al dar positividad se prueba la existencia de violación sexual. La técnica de P30 es un método inmunocromatográfico el cual es muy específico debido a que ningún factor patógeno externo altera el resultado, incluso cuando existe poca concentración de muestra esta técnica aún puede detectar esta proteína. La coloración Christmas Tree es una tinción específica para el espermatozoide y del mismo modo artefactos ajenos al espermatozoide no se tiñen al usar este método. De acuerdo con el análisis de las 200 muestras se verificó que, la temperatura óptima para la conservación de las muestras es la refrigeración con una humedad del 55%, para que la cacetita de detección sea confiable en un 100%. El espermatozoide se mantiene intacto siempre que este se conserve a una temperatura de congelación,  $-5^{\circ}\text{C}$  o menos, y con una humedad del 85%, la humedad se encuentra elevada, (esto se debe por el proceso de descongelamiento que sufre la muestra para poder ser procesada), la rápida congelación hace que los espermatozoides se mantengan, además ayuda el medio de conservación que debe ser papel celulosa. Todo esto nos ayuda a aumentar el porcentaje de detección de la prueba a un 98%.

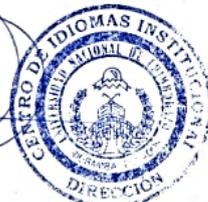
**Palabras Clave:** Delitos Sexuales, Proteína P30, Imonocromatografía, Tinción Christmas Tree.

## SUMMARY

Sexual crimes have increased alarmingly during last 5 years, therefore, the collection of evidences, evidence analysis, and result reports from a forensic laboratory is essential in order to solve sexual crime cases. The techniques to evidence the existence of a sexual offense are P30 determination and Christmas Tree Coloration technique. Both techniques are dependent to each other. When the two of them turn positive, the existence of rape is proven. The P30 technique is an immunochromatographic method which is very specific because no external pathogenic factor alters the result; even when there is little sample concentration this technique can still detect this protein. The Christmas Tree coloration is a specific stain for the sperm and similar foreign artifacts do not stain the spermatozoon when using this method. According to the analysis of the 200 samples, it was verified that, the optimum temperature for the conservation of the samples is the refrigeration with a 55% humidity, so that the detection's cache is 100% reliable. The sperm remains intact as long as it is freeze under  $-5^{\circ}\text{C}$  or less temperature, and with a humidity of 85%. The humidity is high (this is due to the thawing process that the sample undergoes). The rapid freezing and preservation environment cause the sperm to remain. Cellulose paper should be used to preserve it. All of them together help to increase a 98% reliable test result.

**Keywords:** Sexual Offenses, P30 Protein, Imonocromatography, Christmas Tree Stain.

**Reviewed and corrected by:** Lie: Armijos Monar Jacqueline, MSc.



## INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la humanidad la población femenina ha sido abusada y acosada por el sexo masculino, ya que vivíamos en una sociedad machista. Desde mediados del siglo XVII la vida y los derechos de la mujer comienzan a aflorar dentro de la sociedad, y poco a poco fue creciendo a nivel mundial, reconociendo ciertos derechos por el parlamento de esa época, desde ese entonces se comienza a frenar poco a poco el abuso hacia la mujer, aunque no en su totalidad. En la actualidad se busca erradicar este abuso hacia la mujer ya que todos tenemos los mismos derechos y obligaciones, pero aun así todavía existen rastros de acoso a la mujer en un buen porcentaje en varios países, un estudio multipaís realizado en el 2013 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere: “que la violencia sexual variaba entre 6% en Japón y 59% en Etiopía, con tasas de 10% a 50% en la mayoría de los entornos”<sup>(1)</sup>. Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos año 2010, a nivel Nacional los índices de violencia sexual son del 14,5% al 25,7%<sup>(2)</sup>, de los cuales 226 casos fueron reportados por violación sexual a niños y niñas de menos de 10 años<sup>(3)</sup>. En Riobamba, los índices de violencia sexual son alarmantes, se estima que, el 20% de casos se reportan como abuso sexual<sup>(4)</sup>.

La proteína P30, es una sustancia específica secretada por el hombre a nivel de la próstata, esta se activa al momento de la excitación y tiene como función el mantener a los espermatozoides con vida y de lubricar al momento de la relación sexual, esta proteína se encuentra presente incluso en hombres que se han practicado una vasectomía, o en hombres asospermicos, e incluso la ausencia de testículos es independiente a la segregación de esta proteína<sup>(5)</sup>.

El ámbito profesional, el Laboratorio Forense desempeña un papel importante para la determinación de existencia de un delito sexual, la determinación de proteína P30, que se valora de forma cualitativa, positivo, negativo o trazas dependiendo de la concentración que presente la muestra, en lo posterior se procede a utilizar la técnica de coloración en placa Christmas Tree, para observar la presencia o ausencia de espermatozoides.

En el caso de mostrarnos resultados negativos para espermatozoides se puede complementar con el estudio obtenido de P30 ya sea positivos o trazas se habla de una violación sexual, la degradación que presentan las evidencias es un punto fundamental para obtener resultados oportunos y eficaces y así emitir una sentencia frente a un abuso sexual, es así que, el presente trabajo de investigación se basa en la validación de resultados dados en casos de delitos sexuales, aplicando las técnicas de determinación de P30 y técnica de coloración de Christmas Tree, para constatar la eficacia de las pruebas utilizadas y el orden de su respectiva ejecución.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el laboratorio de Biología Forense, para la determinación de existencia de un abuso sexual, los análisis a realizar son P30 y coloración Christmas Tree, mismo que se ejecutará en prendas procedentes del lugar de los hechos donde exista maculaciones aparentemente de semen, ya sea en vestimentas de la víctima o del presunto agresor o en cualquier superficie en el cual se haya efectuado el abuso, estos análisis al presentar resultados positivos, ayudará al investigador forense a obtener pruebas para la resolución de un caso y son un apoyo en el ámbito legal mismo que contribuirá para la correcta aplicación de la justicia.

La coloración Christmas Tree es complementaria al existir positividad en proteína P30, esta tinción ayudará a identificar espermatozoides en placa, dichos organismos se pueden observar completos, solo cabeza o solo la cola, esto dependiendo del tipo de soporte sólido de donde se recolectó la muestra, al presentarse en la placa se reportará como positivo y dicho resultado servirá como prueba contundente de existencia de abuso sexual. El hecho de que P30 sea positivo, pero no se observa espermatozoides, no significa que no ha existido existencia de un delito sexual.

## **JUSTIFICACIÓN**

Dentro del (Código Orgánico Integral Penal) COIP **Artículo 171.** menciona que: Es violación el acceso carnal, con introducción total o parcial del miembro viril, por vía oral, anal o vaginal; o la introducción, por vía vaginal o anal, de objetos, dedos u órganos distintos al miembro viril, a una persona de cualquier sexo. Quien la comete, será sancionado con pena privativa de libertad de diecinueve a veintidós años <sup>(6)</sup>. Esto con respecto a lo

establecido por la ley para personas que cometen delitos sexuales, pero así como existen leyes para quienes atentan contra la integridad humana existen leyes y estamentos para los peritos que analizan las evidencias para resolver los casos es así que se enuncia en el Art. 18.- Obligaciones Generales del perito los siguiente:

“Los peritos calificados desempeñarán su función de auxiliares de la justicia con objetividad, imparcialidad, responsabilidad, oportunidad, puntualidad, rectitud, corrección y honestidad. La obligación del perito es única e integral y comprende las siguientes actividades: cumplir con la designación dispuesta por la autoridad judicial competente, la presentación del informe verbal y/o escrito, la presentación de aclaraciones, ampliaciones u observaciones a informe, la defensa y/o exposición del informe en audiencias orales, de prueba o de juicio; así como cualquier otra actividad necesaria dispuesta por autoridad judicial competente. En el caso de las personas jurídicas, las obligaciones serán cumplidas por cada uno de los expertos que formen parte de ellas y se hayan calificado como peritos; la persona jurídica calificada como perito tendrá responsabilidad solidaria respecto al cumplimiento de dichas obligaciones, debiendo garantizar que sus condiciones de organización, físicas y tecnológicas permitan a sus peritos cumplir sus funciones a cabalidad”<sup>(7)</sup>.

Es por eso que el presente estudio se enfocara en la evaluación de técnicas dependientes para el análisis forense en soportes sólidos en la validación de los delitos sexuales, lo cual nos ayudará a catalogar la presencia o ausencia de dos componentes fundamentales como es la proteína P30 y espermatozoides, para lograr evaluar la eficacia de cada prueba dependiendo del estado que se encuentre la muestra y las condiciones externas que lo afecte, esto contribuirá a al investigador forense al momento de ejecutar pruebas para determinación de P30 y observación de espermatozoides. El análisis de dichas muestras es de fundamental importancia para determinar existencia de delitos sexuales, se realiza una investigación en el que la participación del laboratorio forense es crucial para presentación de pruebas durante un litigio, al encontrar al autor de los hechos será castigado severamente por la ley. La información aportada en este trabajo, servirá de apoyo para mejorar los estándares de calidad, en cuanto a la ejecución de procedimiento para el procesamiento de evidencias por delitos sexuales, para lo cual se utilizará como recurso fundamental muestras conservadas del Centro de investigación de Ciencias Forense de la provincia de Tungurahua.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar dos técnicas dependientes para el análisis forense en soporte sólidos en la validación de los delitos sexuales.

### **Específicos**

- Analizar P30, en muestras conservadas obtenidas en casos de delitos sexuales mediante la técnica de inmunoensayo.
- Verificar la presencia de Espermatozoides mediante la técnica de coloración Christmas Tree, en muestras conservadas obtenidas en casos de delitos sexuales.
- Contrastar resultados de P30 con Christmas Tree para que se obtenga la eficacia de cada prueba con el fin de proponer protocolos adecuados, para el procesamiento de evidencias derivadas de delitos sexuales.

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

Los delitos sexuales son uno de los problemas más frecuentes en los últimos 5 años, reportándose al menos dos en cada semana, razón por la cual la importancia de tener un procedimiento correcto para el procesamiento de las evidencias es fundamental para la pronta resolución de casos.

Existen dos puntos fundamentales a considerar para aportar con la justicia en la República del Ecuador, uno es el estudio y análisis de la proteína P30, proteína fundamental que secreta el hombre al momento de la relación sexual, y segundo el estudio microscópico de los espermatozoides mediante la coloración Christmas Tree.

### **EL LÍQUIDO SEMINAL**

El semen se compone por múltiples compuestos químicos y células llamadas espermatozoides, mismas que se producen en las glándulas seminales. La principal célula producida por dichas glándulas, es el espermatozoide, mismo que, en el laboratorio de Biología Forense es de suma importancia para su evidenciación en delitos sexuales, causados por el hombre, también llamado en el COIP como asaltante, ya que deja máculas como prueba de la existencia del acto sexual, que se pueden encontrar en distintos tipos de soportes sólidos tales como: ropa, sabanas, colchón, almohadas, etc. Pero en caso de que no se puedan observar a simple vista, se las expone bajo luz de lámparas Ultra Violeta (UV) para identificar la ubicación exacta de la maculación para su posterior análisis.

La mayor parte del líquido seminal se compone de secreciones de los órganos reproductivos masculinos.

- El 46 a 80 por ciento del líquido es producido por las vesículas seminales.
- El 13 a 33 por ciento por el casquillo de la próstata.
- El 5 por ciento de los testículos y del epidídimo.
- El 2-5 por ciento de los casquillos Bulbouretrales y uretrales <sup>(8)</sup>.

El semen también está compuesto por las siguientes sustancias:

**Tabla 1:** Componentes del líquido seminal

Fructosa	Calcio	Sodio
Ácido ascórbico	Cloro	Potasio
Zinc	Ácido cítrico	Vitamina C
Colesterol	Vitamina B12	Ácido láctico
Proteínas	Fósforo	Magnesio

**Fuente:** Robertson Sally, 2015 [https://www.news-medical.net/health/Swallowing-Semen-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Swallowing-Semen-(Spanish).aspx)

**Volumen del semen:**

El volumen eyaculado normal es de 3 ml. Con un rango de 1 a 6 ml. La cantidad de espermatozoides es de 60 a 100 millones de espermatozoides por ml<sup>(9)</sup>. El volumen total de líquido seminal y número de espermatozoides puede variar por ciertos factores mismos que pueden ser por el intervalo previo a la eyaculación o por la actividad metabólica de la próstata, y, en casos patológicos el número de espermatozoides decrece en enfermedades como la oligospermia y azoospermia.

El tiempo de viabilidad del espermatozoide después del eyaculado varía de acuerdo al lugar físico de su ubicación:

**Tabla 2:** Tiempo de vida de los espermatozoides según el lugar del cuerpo en que fueron depositados.

Parte del cuerpo en donde se depositaron	Tiempo en horas
Vagina, parte interna y externa	120
Recto	65
Ano	46
Región oral	6 – 9

**Fuente:** <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/rapidosp2008/INF-2008-011.pdf>

Por lo tanto se piensa que se podría evidenciarlo fácilmente tiempo después de haber cometido el delito sexual.

## **EL SEMEN COMO EVIDENCIA**

En el Laboratorio de Biología Forense se analiza las muestras que presentan máculas de semen, o en soportes sólidos con posibles maculaciones. Las personas asignadas a resolver estos casos son los peritos forenses, quienes son asignados a la recopilación de las evidencias y que siguen un protocolo para la identificación, recolección, embalaje y envío de muestras. Cada evidencia debe tener cadena de custodia cuyo objetivo fundamental es de mantener las características de cada uno de los indicios y así asegurar la inalterabilidad de evidencias registrándolos como documentos legales. Dicho documento deberá tener: nombre de la víctima, nombre del fiscal de turno, nombre del perito, lugar, fecha, e información detallada exacta del indicio.

Las muestras codificadas son receptadas en el laboratorio como evidencias, en donde se constatará la información de la documentación junto con la evidencia. Las muestras a analizar son las que presentan maculaciones visibles, las que no presentan, se debe observar con la lámpara de espectro UV, una vez ya identificada la ubicación de la mácula se procede a realizar un corte y posteriormente se realiza la técnica de identificación de P30 y con ello el análisis comparativo con información de resultados de perfiles genéticos del posible asaltante.

## **ASPECTOS RELEVANTES EN LA TOMA DE MUESTRA DEL SEMEN**

Para la búsqueda de evidencias de líquido seminal dentro de la escena del crimen se debe prestar mucha importancia a las prendas íntimas de la víctima y del sospechoso. Además, se debe revisar la presencia de máculas en soportes sólidos como toallas, sábanas, papel sanitario, toallas sanitarias, asientos del auto, pañuelos, etc.

El biólogo forense es el encargado de recolectar muestras de sitios anatómico de la víctima, generalmente se realiza hisopados en las cavidades vaginal, anal y en ocasiones en la cavidad bucal.

El tiempo es un elemento fundamental para la recolección de material biológico para realizar la identificación del agresor, para esto se debe tomar los siguientes aspectos:

- Toma de muestras realizadas entre 3 y hasta 6 días después del ataque sexual, puede ofrecer resultados negativos

- Se debe evitar que la víctima se bañe o se realice lavado vaginal, anal, oral, o donde el mismo haya manifestado que hubo ataque sexual, ya que esto afecta de manera importante la presencia de semen.
- La muestra se debe trasladar lo más pronto posible al laboratorio y a la víctima a la clínica del médico forense <sup>(9)</sup>.

## **IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA P30 EN DELITOS SEXUALES**

La proteína “P30” es un importante marcador cualitativo para el estudio forense de los delitos sexuales, es una prueba fundamental para la determinación de existencia de un delito sexual.

La presencia de esta proteína en el plasma seminal es mayor a causa de que es una glicoproteína de ese origen, y que pesa cerca de 30,000 daltons, que es idéntica al antígeno de próstataespecífico, y que corrientemente viene siendo estudiado como un marcador de cáncer en la próstata <sup>(10)</sup>.

La P30 no se encuentra en ninguna secreción femenina o en tejidos humanos ajenos a la próstata, por esta razón es específica propia del aparato reproductor masculino. Esta proteína puede ser determinada cuantitativamente por medio de electroforesis o por ensayo inmunoabsorbente de enzimas. El semen puede no encontrarse al transcurrir 24 horas entre el acto de violación y la recolección de la muestra en cavidades vaginal o anal, también puede no encontrarse si el agresor eyaculó sobre la piel de la víctima o simplemente no eyaculó.

### **Determinación P30**

La prueba para la detección de la P30 es una técnica forense nueva donde se detecta 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 específicamente masculina. Es importante recordar que la ausencia de espermatozoides, no garantiza la inexistencia de una agresión sexual. Los espermatozoides pueden no encontrarse, si han transcurrido más de 24 horas entre el asalto y la recolección de la evidencia, o si el atacante no eyaculó, pero si puede ser encontrada la proteína P30, esto último es poco conocido entre los ofensores sexuales <sup>(11)</sup>.

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

### **Muestra requerida**

Las muestras en las que se realiza la determinación de P30 son: hisopados geniales, esto incluye cavidades vaginal, anal, bucal e hisopados extra genitales, manchas sospechosas en soportes solidos como prendas íntimas, preservativos, entre otros.

### **Interpretación de resultados**

**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” <sup>(5)</sup>.

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

Esto puede indicar que:

- a) P30 no está presente sobre 4 ng/ml.
- b) Presencia de efecto prozona” <sup>(5)</sup>.

“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.

**Invalidez:** 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” <sup>(5)</sup>.

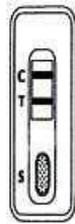
### **Limitaciones**

1. “Los casetes inmucromatográficos para determinación de proteína P30 es solo para detección in vitro de semen. No para uso diagnóstico.
2. El test debe ser desarrollado en estricto acuerdo con estas instrucciones para tener resultados seguros y reproducibles.
3. Si se sospecha un elevado nivel de P30 y el resultado obtenido es negativo el test debe ser repetido con una muestra fresca.

4. Resultados positivos se podrían obtener con muestras de orina masculina las cuales han reportado un valor de P30 260ng/ml. El antígeno específico de la vesícula seminal debe no estar presente en la prueba con orina.
5. Una muestra apropiada debe ser usada puesto que P30 es detectable en el tracto vaginal solo en un máximo de 2 días”<sup>(5)</sup>.

### Especificidad

- a) “La hemoglobina (10gr/l) bilirrubina (100mg/l) y muestras lipémicas (5 g/l) no interfieren con los resultados de la prueba.
- b) Concentraciones altas de proteína tales como fosfatasa ácida prostática (1000ng/ml) albumina (20g/l) HCG (900UI/ml) transferrina (5g/l) y prolactina (1mg/l) no interfieren con los resultados de la prueba.
- c) Se pueden obtener resultados positivos en hombres vasectomizados y en muestras de orina pos eyaculación en adultos”<sup>(5)</sup>.



**POSITIVO**



**NEGATIVO**



**INVÁLIDO**

**Imagen 1:** Resultados de determinación de P3.

**Fuente:** [http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Arca%20Ciencias%20Forenses/6\\_\\_Manual\\_de\\_Procedimientos\\_de\\_laboratorio\\_de\\_Biologia\\_Forense.pdf](http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Arca%20Ciencias%20Forenses/6__Manual_de_Procedimientos_de_laboratorio_de_Biologia_Forense.pdf)

### TINCIÓN CHRISTMAS TREE PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

El espermatozoide es un elemento celular propio del líquido seminal, debido a su morfología, el material nuclear se tiñe de color rojo o rojo purpura, he ahí su nombre como rojo nuclear, la cabeza del espermatozoide con su forma característica ovala se tiñe de un rosado ligero, es decir, el acrosoma. La cola o también y región media se tiñe con el segundo reactivo llamado pícrico índigo carmín, mismo que da un color verde o azul verdoso a la cola del espermatozoide. Debido a la sensibilidad de los espermatozoides es necesario realizar

control de calidad a las tinciones para garantizar una buena tinción y a su vez, un buen reporte de resultados.

### **Muestra requerida**

Las muestras se receptan en el laboratorio de Biología Forense como evidencia, mismas que son recolectadas del lugar de los hechos o, a su vez, frotis recolectados de la víctima de las cavidades genitales, para genitales y extra genitales.

### **Principio**

Con el rojo nuclear sólido se obtiene una tinción nuclear sencilla. El rojo nuclear sólido es un colorante ácido que pertenece al grupo de los colorantes de antraquinona. A través de la adición de sulfato de aluminio, que en este caso hace de mordiente, se produce una laca colorante que permite la tinción nuclear en rojo<sup>(13)</sup>.

### **Preparación de Reactivos**

Reactivo 1: Rojo nuclear Kernechtrot pH: 2.0 (ácido)

**Tabla 3:** Preparación de reactivo 1 de la tinción Christmas Tree

<b>COLORANTE ROJO RÁPIDO NUCLEAR KERNECHTROT (SOL.1)</b>	
<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Sulfato de aluminio	2.5 gr
Rojo rápido nuclear	0.05 gr
Agua destilada	100 ml

**Fuente:**

[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)

Reactivo 2: Pícrico Índigo Carmín pH: 14.0 (básico)

**Tabla 4:** Preparación de reactivo 1 de la tinción Christmas Tree

<b>COLORANTE ROJO RÁPIDO NUCLEAR KERNECHTROT (SOL.2)</b>	
<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Acido pícrico	100 ml
Índigo carmín	0.33 gr

**Fuente:**

[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)

## Observación

La placa debe estar correctamente codificada para su posterior almacenamiento, una vez enfocado se recorre minuciosamente la placa en búsqueda de espermatozoides. Debido a la naturaleza de la muestra o el tiempo que ha transcurrido desde el acto sexual hasta la recolección de la muestra, se podrá encontrar ya sea espermatozoides completos, solo cabeza o solo cola, y cualquiera de estas estructuras, al ser encontradas, se reportarán como positivo.



*Imagen 2: Observación de espermatozoides con tinción Christmas Tree. Fuente: [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)*

Se reporta como presencia o ausencia de espermatozoides, cuando el material celular es insuficiente se puede reportar como material insuficiente para emitir un resultado <sup>(5)</sup>.

## Limitaciones

Por la naturaleza de la muestra y el tratamiento que se da en la preparación de los extractos es posible observar morfologías atípicas tales como la ausencia de cola. <sup>(5)</sup>.

## ASPECTOS LEGALES EN RELACIÓN A DELITOS CONTRA LA INTEGRIDAD SEXUAL Y REPRODUCTIVA.

En el área legal, los casos dictaminados como violación en un delito grave que se paga con años en la cárcel, es aquí donde el análisis de las evidencias es fundamental para la exculpación o absolución del posible autor de los hechos y, por el mismo motivo es importante mencionar los artículos que se incumple al realizar un delito de dicha magnitud.

**Artículo 170.- Abuso sexual.** - La persona que, en contra de la voluntad de otra, ejecute sobre ella o la obligue a ejecutar sobre sí misma u otra persona, un acto de naturaleza sexual, sin que exista penetración o acceso carnal, será sancionada con pena privativa de libertad de tres a cinco años <sup>(6)</sup>.

**Artículo 171.- Violación.** - Es violación el acceso carnal, con introducción total o parcial del miembro viril, por vía oral, anal o vaginal; o la introducción, por vía vaginal o anal, de objetos, dedos u órganos distintos al miembro viril, a una persona de cualquier sexo. Quien la comete, será sancionado con pena privativa de libertad de diecinueve a veintidós años <sup>(6)</sup>.

**Artículo 141.- Femicidio.** - La persona que, como resultado de relaciones de poder manifestadas en cualquier tipo de violencia, dé muerte a una mujer por el hecho de serlo o por su condición de género, será sancionada con pena privativa de libertad de veintidós a veintiséis años <sup>(6)</sup>.

## **METODOLOGÍA**

### **Tipos de investigación:**

**Descriptiva:** A través del cual se detalla la investigación y el procedimiento a realizar, para determinar las características y diferencias principales de la técnica aplicada.

**Cuasi Experimental:** Debido que es una derivación de un estudio ya realizado en el cual se va a evaluar si existen resultados positivos de p30 de muestras conservadas en 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 conservados, y 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 nos ayudara a determinar la presencia o ausencia de proteína p30 en muestras previamente conservadas durante cinco años.

**Cuantitativo:** Mediante este método se determinará cuantas pruebas de p30 expuestas a diferentes temperaturas salieron positivas y cuantas negativas.

### **Tipo de estudio:**

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

### **Población y muestra**

**Población:** Doscientas muestras previamente en conservación.

**Muestra:** Se trabajará con el total de la población conservadas de hace 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 y determinación de P30.**

1. Observar el soporte solido en la luz forense.
2. Identificar la zona en donde existe fluorescencia para determinar la ubicación del
3. supuesto fluido biológico.
4. La extracción de muestras en soportes solidas se realizará mediante un corte de 0.5 x 0.5 cm. O con un corte longitudinal en el hisopo.
5. Se procede a colocar en un tubo ependorf.
6. Agregar una alícuota con 750ul de buffer de extracción.
7. Agitar en un dispositivo Vortex por 5 minutos.
8. Colocar en refrigeración por dos horas (2-8°C) Este procedimiento recupera aproximadamente el 99% de p30 extraída del hisopo.
9. se pone la muestra en el Vortex cada 20 minutos mientras reposa en refrigeración.

10. Dejar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
11. Centrifugar la muestra 3 minutos a 3.600 rpm después del paso de extracción.
12. Remover el dispositivo y el gotero del paquete sellado.
13. Etiquetar el dispositivo con el número de caso.
14. Adicionar 300ul (6-7gotas con el gotero) de la muestra al pocillo “S” del dispositivo.
15. Leer los resultados a los 10 minutos.
16. 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.

### **Procedimiento para coloración Christmas Tree**

- Visualizar en la placa donde se encuentra el frotis y delimitar el frotis con lápiz demográfico.
- Fijar el frotis a calor seco o exponerlo a la llama directamente.
- Colocar unas cuantas gotas (que cubra el frotis) de la solución Kernechtrot (rojo nuclear) y dejar actuar por 20 minutos (Reactivo 1).
- Lavar con agua destilada.
- Colocar unas cuantas gotas (que cubra el frotis) de la solución picroíndigocarmine y dejar actuar de 10 a 15 segundos (Reactivo 2).
- Aclarar el frotis con etanol al 95 %.
- Dejar secar y montar la placa.
- Observar en lente 40 X.

## **RESULTADOS Y DISCUCIONES**

Las pruebas que se utilizan en el Laboratorio de Ciencias Forenses para la determinación de la existencia de un presunto delito sexual son importantes para el apoyo a la justicia y la resolución de casos, estas pruebas tienen el poder de privatizar de la libertad a un individuo o lo pueden llevar a su inocencia, por lo que el profesional encargado del peritaje del caso, debe hacerlo cuidadosamente y evitando posibles errores, antes, durante y después de procesados los indicios.

Para ello se analizó la presencia de P30 en muestras conservadas hace 5 años (2013), a distintas temperaturas, para luego verificar la presencia de espermatozoides en cada una de las muestras y finalmente contrastar ambos resultados para determinar la temperatura y condiciones más viables para la preservación de la muestra y de sus componentes, es decir, la conservación la proteína P30 junto con los espermatozoides y de este modo evaluar las dos técnicas utilizadas en este esclarecimiento de los hechos.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se analizó un total de 200 muestras que anteriormente fueron procesadas en peritajes, dichas muestras al momento de ser analizadas los resultados tanto positivos como negativos aportó con pruebas contundentes de la existencia o no de una violación sexual, y mediante estas pruebas se logró aplicar justicia al presunto autor de los hechos de acuerdo al Código Orgánico Integral Penal.

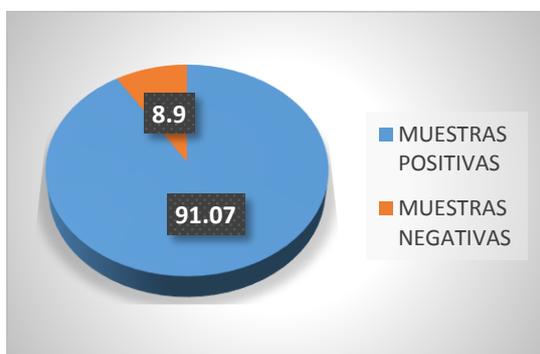
Estas muestras se conservaron a distintas temperaturas con porcentajes de humedad diferentes con el fin de realizar una investigación debido a que en algunas ocasiones se ha vuelto a reabrir casos y se exige un nuevo análisis de las muestras, por lo tanto, no existe investigación científica que aporte con información en cuanto a la degradación de la muestra al pasar los años y se desconoce el porcentaje de deterioro tanto de la proteína P30 como de los espermatozoides.

**Tabla 5:** Total de muestras analizadas de proteína P30

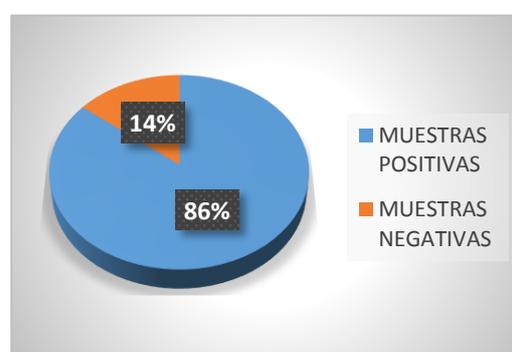
MUESTRAS ANALIZADAS DE PROTEÍNA P30				
TEMPERATURA (°C)	HUMEDAD (%)	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL DE MUESTRAS
14	75	51	5	56
20	80	48	8	56
4	55	52	0	52
-5	85	33	3	36
<b>Total de muestras</b>		<b>184</b>	<b>16</b>	<b>200</b>
<b>Porcentaje (%)</b>		<b>92</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Fuente: Chávez Vera, Moscoso Moreno

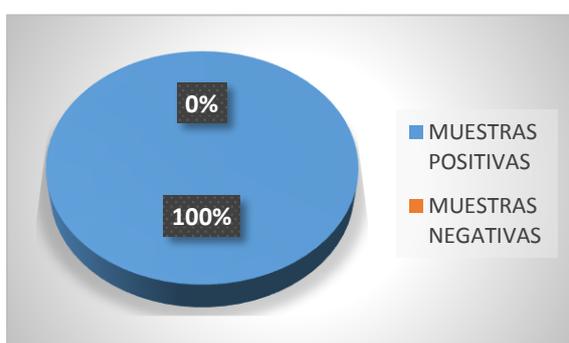
**Grafica 1:** Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad



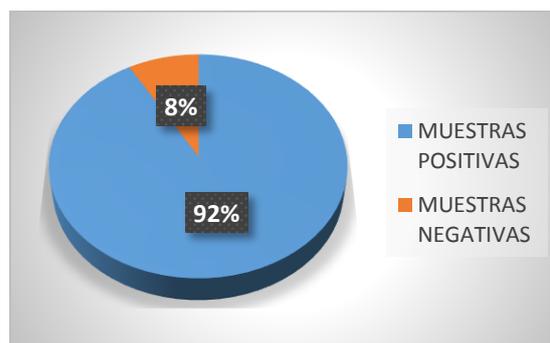
**Grafica 2:** Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad



**Grafica 3:** Muestras conservadas a 4 °C y 55% de humedad.



**Grafica 4:** Muestras conservadas a -5 °C y 85% de humedad



Fuente: Chávez Vera, Moscoso Moreno

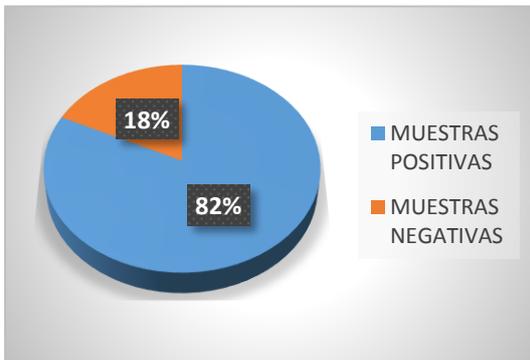
Del total de 200 muestras analizadas sometida a diferentes temperaturas, que se encontraron a 14°C, 20°C, 4°C y 55°C, de las cuales a 14°C y con una humedad del 75% nos dio positivas para P30 el 91.07%, a 20°C y con una humedad del 80%, nos dio positividad para P30 el 86%, a 4°C y con una humedad del 55%, nos dio positividad para P30 el 100% y a -5°C nos dio positividad para P30 el 92%.

**Tabla 6:** Total de muestras analizadas con tinción Christmas Tree

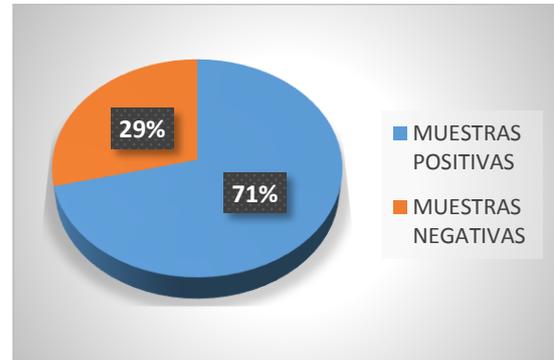
MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE LA TINCIÓN CRHISTMAS TREE				
TEMPERATURA (°C)	HUMEDAD (%)	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL DE MUESTRAS
14	75	46	10	56
20	80	37	15	52
4	55	39	2	41
-5	85	50	1	51
<b>Total de muestras</b>		<b>172</b>	<b>28</b>	<b>200</b>
<b>Porcentaje (%)</b>		<b>86</b>	<b>14</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

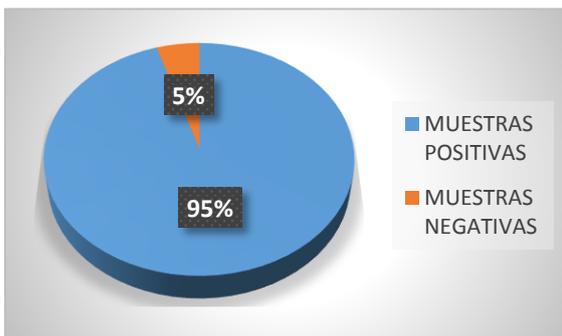
**Gráfica 5:** Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad



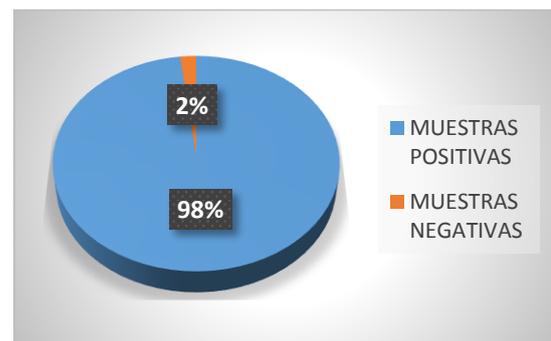
**Gráfica 6:** Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad



**Gráfica 7:** Muestras conservadas a 4°C y 55% de humedad



**Gráfica 8:** Muestras conservadas a -5°C y 85% de humedad



**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

Se analizaron un total de 200 muestras a diferentes temperaturas, mismas que se encontraron a 14°C, 20°C, 4°C y 55°C, de las cuales a 14°C y con una humedad del 75% resultó positivas para espermatozoides con 82% de efectividad, a 20°C y con una humedad del 80%, los resultados fueron positivos con un 71%, a 4°C y con una humedad del 55%, nos dio

positividad del 95% y a -5°C con humedad del 85%, produjo resultados positivos con un 98%.

### MUESTRAS ANALIZADAS DE PROTEÍNA P30

**Tabla 7:** Total de muestras analizadas con técnica P30

<b>MUESTRAS ANALIZADAS CON TÉCNICA DE PROTEÍNA P30</b>				
<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>HUMEDAD (%)</b>	<b>MUESTRAS POSITIVAS</b>	<b>MUESTRAS NEGATIVAS</b>	<b>TOTAL DE MUESTRAS</b>
14	75	51	5	56
20	80	48	8	56
4	55	52	0	52
-5	85	33	3	36
<b>Total de muestras</b>		<b>184</b>	<b>16</b>	<b>200</b>
<b>Porcentaje (%)</b>		<b>92</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

De acuerdo con el análisis de las 200 muestras en total, las muestras que mejor mantuvieron sus resultados de P30 con 100% de efectividad fueron las conservadas a refrigeración. Esta proteína sufre una degradación mínima al existir mayor temperatura y mayor humedad, aunque es posible encontrar P30 en muestras en congelación y temperatura ambiente, pero en estos casos existe un margen de error mínimo, por lo tanto, los resultados más confiables son los obtenidos a temperatura de 4°C.

Las muestras con mayor porcentaje de error fueron las que se conservaron a 20°C y 80% de humedad, la razón por la que presenta dichos errores es la degradación de la proteína por el ambiente en que se conservó, aunque la P30 se desnaturaliza a temperaturas mayores de los 80°C, hay que tomar en cuenta que las condiciones también afectan a la preservación de esta proteína, y también depende del soporte sólido en el que se encuentre. De este modo se confirma que, a mayor temperatura y humedad, menor es la conservación de P30.

En el caso de las muestras congeladas, presenta mayor porcentaje de humedad debido a que, al momento de analizarlas tuvieron que descongelarse a temperatura ambiente, y al pasar por dicho proceso se generó agua producto de la descongelación y generando más humedad haciendo que el área visible de la mácula sea menos detectable y haciendo que exista menos cantidad de proteína en el soporte sólido.

## Control de calidad de las cacetas de p30

Para lograr un resultado eficiente en cuanto a la detección de la proteína P30 antes de comenzar el análisis de las muestras, se debe evidenciar la calidad y confiabilidad del producto que se está utilizando para el estudio, es así que el control de calidad es importante para el argumento de este trabajo, para ello se utilizó muestras que se conocía su resultado y sobretodo frescas. Para ello se debe tomar en cuenta varios aspectos entre ellos:

- Siempre regirse al procedimiento emitido por un manual dentro de la caja de reactivos.
- Tomar en cuenta tiempos y temperatura a la que se realiza la prueba.
- Evidenciar la calidad de la muestra que se va a pasar como control, para verificar la funcionalidad de la caceta, y de esta forma obtener resultados verdaderos.

## MUESTRAS ANALIZADAS CON TÉCNICA DE TINCIÓN CHRISTMAS TREEE

**Tabla 8:** Total de muestras analizadas con tinción Christmas Tree

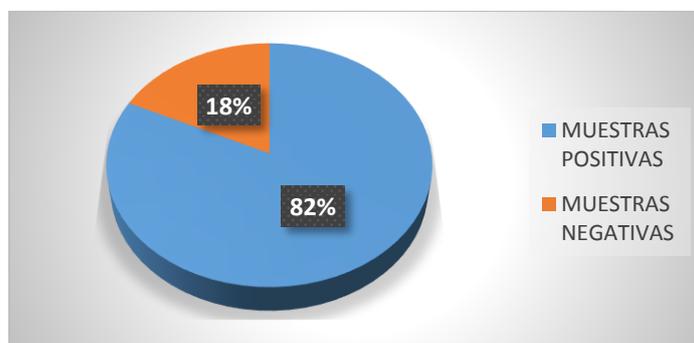
MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE LA TINCIÓN CHRISTMAS TREE				
TEMPERATURA (°C)	HUMEDAD (%)	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL DE MUESTRAS
14	75	46	10	56
20	80	37	15	52
4	55	39	2	41
-5	85	50	1	51
<b>Total de muestras</b>		<b>172</b>	<b>28</b>	<b>200</b>
<b>Porcentaje (%)</b>		<b>86</b>	<b>14</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

En cuanto a las muestras analizadas con tinción Christmas Tree, la mejor temperatura para la preservación morfológica del espermatozoide es la de -4°C. El espermatozoide al ser una célula muy susceptible a cambios de temperatura y humedad tiene que conservarse correctamente, la congelación garantiza la preservación intracelular y extracelular la célula espermática, en caso que la muestra sea congelada de inmediato, se congelará solo los líquidos extracelulares obteniendo de este modo una célula deshidratada manteniendo su morfología completa, a mayor temperatura y mayor humedad esta célula se fragmenta y se

puede observar cabezas con fragmentos de cola o solo cabezas. Otra de las temperaturas muy aceptables de su preservación es la refrigeración, aunque tiene 2 placas negativas, esto debido a la naturaleza del soporte sólido de la muestra, aun así, se puede decir que sus resultados son confiables y eficaces.

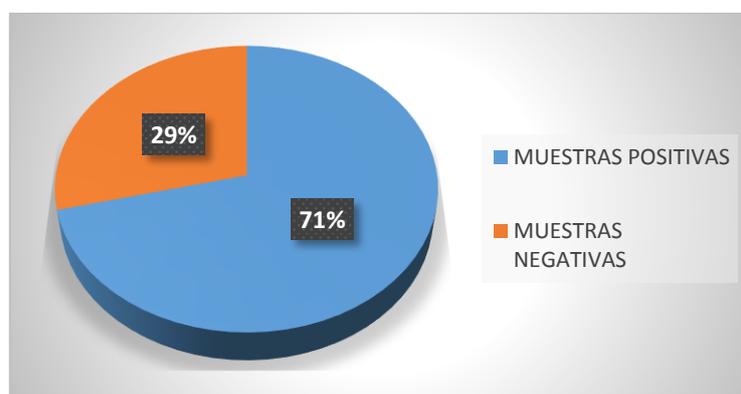
**Gráfica 9:** Muestras conservadas a 14°C y 75% de humedad



**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

Las muestras analizadas a temperatura de 14°C con humedad de 75%, se determinó que, de un total de 56 muestras, el 82% resultaron positivas y el 18% negativas. Esto se debe a que, al ser una célula demasiado frágil, si no se mantiene las muestras en condiciones adecuadas puede observarse fragmentado, o simplemente no se puede observar un espermatozoide en toda la placa.

**Gráfica 10:** Muestras conservadas a 20°C y 80% de humedad

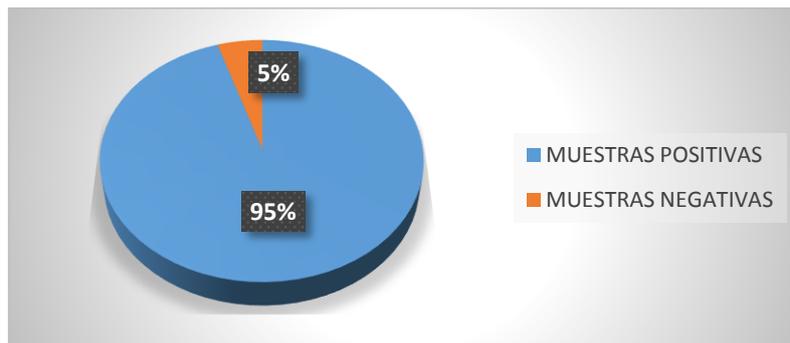


**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

Como segundo punto, las muestras mencionadas anteriormente preservadas a 20°C y 80% de humedad, dieron como resultados 37 placas positivas y 15 negativas, representando el 71% y el 29%. Estos análisis presenta el mayor margen de error, esto se debe a que, a mayor temperatura y humedad, existe menor detección del espermatozoide, debido a que al ser células sexuales expuestas a estas condiciones, se desprende fácilmente la cabeza de la cola, en ocasiones se pudo observar cabezas con fragmentos de cola, solo cabeza o solo cola, aun

así se pudo reportar un resultado positivo, pero el margen de error es demasiado alto como para tener resultados confiables, y esto, al presentarse en un caso judicial puede ser perjudicante para el profesional a cargo de la conservación y preservación de la muestra y habrá muchas inconsistencias al existir resultados opuestos. Por lo tanto, se determinó que las células espermáticas al estar a 20°C y con una humedad 80°C no son viables para resultados confiables.

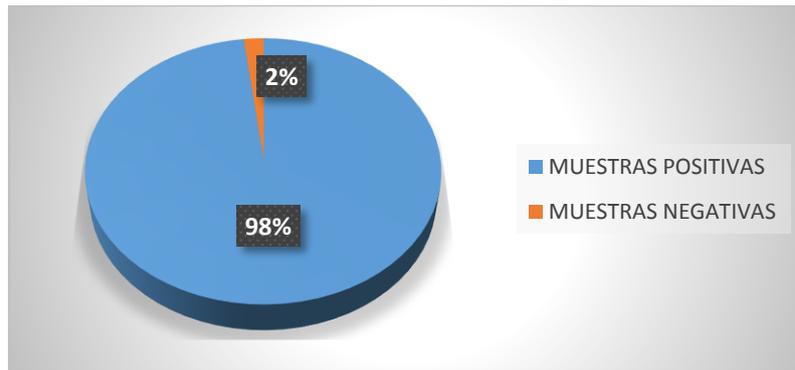
**Gráfica 11:** Muestras conservadas a 4°C y 55% de humedad



**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

En la gráfica número 11 se tiene a las muestras conservadas a temperatura de refrigeración, las cuales fueron a 4°C y a 55% de humedad de los cuales 39 fueron positivas, y 2 negativas, siendo esto el 95% positivos y 5% negativos. Ahora bien, ¿Por qué existe un margen de error de 5% comparando con la técnica de P30 el cual no existe margen de error considerando que son las mismas muestras? Esto se debe a que el espermatozoide como se conoce no sobrevive completo por muchas horas, es decir, en cavidad vaginal sobrevive 120 horas, y en cavidad anal sobrevive a 65 horas, tomando en cuenta que se encuentra dentro de cavidades humanas y a temperatura corporal. Dependiendo de la hora de recolección y del soporte sólido del cual se recogió la muestra, esta célula puede sufrir daños morfológicos y es por esta razón que muy rara vez se observa su morfología completa, aun así, el margen de error es mínimo y se puede considerar como la mejor forma de conservación de las muestras, garantizando de este modo un buen resultado.

**Gráfica 12:** Muestras conservadas a -5°C y 85% de humedad



**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

Por último, del total de 51 muestras, 50 resultaron positivas y tan solo una negativa, con un margen de error de 2%. Ahora bien, en este caso se preserva mejor el espermatozoide en congelación que en refrigeración a comparación de la proteína P30. Estas células se mantienen en mejores condiciones en congelación, debido a que al momento de someter a esta temperatura la célula espermática se preserva intra y extra celular, dependiendo del tiempo de recolección de muestra, mientras más rápido mejor, y, al almacenar las muestras lo más pronto posible solo se congela el agua que se encuentra extracelularmente, dándonos como resultado a la célula deshidratada como tal, y manteniendo de este modo su morfología completa. Por lo tanto, hay que tener precaución al momento de la descongelación de la muestra para su reanálisis de tinción Christmas Tree.

### **Control de calidad de los colorantes**

La tinción Christmas Tree, trabaja con dos reactivos, los cuales son rojo rápido nuclear e índigo carmín, dichos colorantes deben pasar por un control de calidad para garantizar la correcta tinción de los espermatozoides, es por esto que se debe considerar los siguientes puntos:

- Los colorantes deben prepararse de acuerdo al manual establecido en el laboratorio forense, no se debe usar reactivos caducados o reactivos que no sean puros.
- Se debe filtrar mínimo 3 veces cada reactivo, con el fin de evitar posibles interferencias al momento de la tinción y lectura de placas.
- Los reactivos ya preparados se deberán guardar en un rasco color ámbar, con el fin de evitar posibles alteraciones químicas en contacto con los rayos UV.

- Para poder lograr una buena tinción se debe respetar los tiempos establecidos por la técnica.
- Se realizará una placa de muestras ya analizadas anteriormente, con el fin de comparar resultados, si ambos obtienen los mismos resultados significa que la tinción está realizando una buena coloración.

Una vez revisado el control de calidad respectivo, se realizó las placas para observación de espermatozoides mediante la técnica de coloración de Christmas Tree, se trabajó de igual manera con un total de 200 muestras (Tabla 7).

### CONTRASTE DE RESULTADO DE P30 CON CHRISTMAS TREE

**Tabla 9:** Comparación de resultado de proteína P30 y tinción Christmas Tree

MUESTRAS ANALIZADAS DE P30					MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE LA TINCIÓN CHRISTMAS TREE		
Temperatura (°c)	Humedad (%)	Muestras positivas	Muestras negativas	Total de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas	Total de muestras
14	75	51	5	56	46	10	56
20	80	48	8	56	37	15	52
4	55	52	0	52	39	2	41
-5	85	33	3	36	50	1	51
<b>Total de muestras</b>		<b>184</b>	<b>16</b>	<b>200</b>	<b>172</b>	<b>28</b>	<b>200</b>

**Fuente:** Chávez Vera, Moscoso Moreno

Estas dos pruebas fueron sometidas a un procedimiento de confirmación otorgando datos significativos a la hora de aplicar cada una de sus técnicas en muestras conservadas hace 5 años (2013) y a distintas temperaturas y porcentajes de humedad, por lo que con estos resultados se cataloga una mejor y más eficaz a la prueba inmunocromatográfica de P30 teniendo como porcentaje de efectividad del 92%, eso tomando en cuenta la naturaleza del soporte sólido, como conservarla y el medio de preservación, así como también factores externos teniendo como óptimo para el análisis una temperatura de 4 °C con una humedad del 55 %, en este caso como la muestra se encuentra en refrigeración y con bajo humedecimiento disminuye la probabilidad de que la muestra se degrade y la caceta de reacción detecta la presencia de P30.

Por otro lado, en la prueba de Christmas Tree, disminuye el porcentaje de efectividad que es del 86% esto se debe a que se trabaja con células y estas son susceptibles a procesos de degradación mucho más marcados y rápidos, a pesar de que no se encontró células completas por el estado, se observó cabezas y colas, con esto es suficiente para la confirmación del resultado, aunque por su porcentaje no es tan fiable y se recomienda realizar primero P30 y luego tinción Christmas Tree como su complemento.

### **Proceso de secado de muestras posterior a su análisis**

Cuando se trabaja con indicios de casos reabiertos, por lo general las manchas se encuentran en soportes sólidos hechos de algodón, es decir los hisopos, se debe humedecer con solución salina para poder realizar el nuevo extendido de la placa. Al momento de nosotros rehidratar se está generando un exceso de humedad, por lo tanto, al manejar muestras de este tipo, posterior a su uso debe pasar por un procedimiento de secado.

Al utilizar el procedimiento de secado, se evita el exceso de humedad, lo que lleva a la conservación de la proteína P30 y de los espermatozoides, garantizando una buena calidad de muestra en caso de ser necesario otro análisis de la misma.

### **Factores que degrada la muestra**

Las muestras analizadas fueron de los siguientes soportes sólidos: prendas íntimas de la víctima y del presunto agresor, alfombras. Colchones, guantes de látex, preservativos, sábanas, almohadas papel higiénico, hisopado de cavidades vaginal y anal. Es importante mencionar que algunas de las muestras conservadas a temperatura ambiente presentaban un olor característico de inicio de putrefacción, y desarrollo de hongos, debido al porcentaje alto de humedad y, estos factores fueron los que intervinieron en la determinación de P30 y tinción de espermatozoides, dándonos así un resultado negativo y a su vez, un resultado poco confiable.

### **Protocolo de procesamiento de evidencias**

Al momento de que llega una muestra al laboratorio de biología forense, muchos profesionales aplican distinto orden para procesarlas, es decir, no hay un protocolo exacto en que técnica realizar primero, si proteína P30 o Tinción Christmas Tree. Es por esto que

según nuestro criterio el primero procedimiento a realizar es la técnica de proteína P30, por la razón de que esta proteína es específica de los hombres y, al ser analizada por inmunocromatografía, es mucho más certero y sensible. Una vez que se obtenga su positividad, posteriormente se realizará la técnica de tinción Christmas Tree, en el cual la placa deberá ser observada minuciosamente, ya que al encontrar un espermatozoide el resultado ya es positivo.

Existen casos que el resultado de P30 es positivo, pero, la tinción es negativa, y esto se puede dar por múltiples factores, ya sea por la naturaleza de la muestra o cuando el agresor no eyaculo completamente o es azoospermico, aun así, al ser positivo P30 se conoce que existió un delito sexual.

### **Conservación de las muestras**

La mejor temperatura para la conservación de proteína P30 y espermatozoides es la refrigeración, pero, del mismo modo se debe volver a embalar correctamente, es decir, el proceso de embalaje es fundamental para la conservación de las mismas. El mejor material para la preservación de indicios es el papel celulosa, es más resistente al papel ordinario lo cual genera poco desgarre y roturas al momento de manipular los indicios, también absorbe la humedad garantizando que las muestras se encuentren lo más secas posibles, conservando de este modo la estructura de los espermatozoides y de la P30. Es un papel de mayor grosor con una muy fácil manipulación y su adquisición es sencilla y no requiere de un alto precio. Es por todos estos beneficios que aporta para la investigación que el papel celulosa es el mejor medio de embalaje para la correcta conservación de las muestras.

### **Temperatura y humedad**

Son dos factores muy determinantes a la hora de reanalizar una muestra que se encuentra conservada, por lo que ambas pruebas varían el porcentaje de efectividad, claro es que a mayor temperatura y mayor humedad favorece a los procesos de descomposición y putrefacción de las mismas por lo que el procedimiento para detectar proteína P30 tendrá un porcentaje de error de alrededor del 15% y será directamente proporcional al aumento de la temperatura.

Para este caso se hace mucho énfasis a los indicios preservados a temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  y con 85% de humedad, del número total de muestras, el 92%, fueron positivas, y el 8% resultaron negativas. Al existir una temperatura de congelación, la muestra se cristaliza, y aumenta el porcentaje de humedad y al momento de procesarla se requiere que el soporte sólido pase por un proceso de descongelación, y es ahí, cuando aumenta la humedad y la proteína presenta una afección muy baja, aunque aún es detectable. Es por esta razón que el margen de error existe, aunque es mínimo, y aun podemos decir que los resultados son confiables por la existencia del 8.33% de negativos.

Podemos decir con toda seguridad, que las muestras mejor conservadas y sin margen de error fueron las muestras conservadas a temperatura de refrigeración, puesto a que no presento un error y eso es lo que se necesita para un reporte de resultados de excelencia, garantizando el trabajo y el reporte de los casos de agresión sexual que son reabiertos, y de este modo aportar con la justicia.

### **Cadena de frío para el traslado de indicios**

Como su nombre lo indica, es un método en el cual existe un control de la temperatura al momento del transporte de los indicios, para asegurar la conservación de los componentes de las muestras. En el momento del transporte esta de indicios en delitos sexuales es fundamental conservarlos en perfecto estado, y más aún, cuando los soportes sólidos muestran posibles maculaciones de líquido seminal es de suma importancia que el transporte sea en un ambiente controlado para que la proteína no se desnaturalice y se logre detectar mediante inmunocromatografía y que el resultado sea un positivo bien marcado.

## CONCLUSIONES

- Se analizó la P30 en muestras conservadas durante 5 años de delitos sexuales mediante la técnica de inmunoensayo, esta técnica resultó ser muy confiable y eficaz para la determinación de la proteína P30 en los soportes sólidos.
- Se verificó la presencia de espermatozoides en las muestras previamente analizadas de casos de delitos sexuales, de dichas muestras un porcentaje mínimo arrojó resultados negativos debido a la mala conservación de la evidencia y también de acuerdo a la naturaleza de la muestra, en algunas placas se logró observar el espermatozoide fragmentado debido a la humedad y alta temperatura a la que la muestra fue sometida, concluyendo así que la mejor forma de preservar los espermatozoides es la congelación, de este modo se obtiene a la célula como tal deshidratada y manteniendo sus características morfológicas intactas.
- Se contrastó los resultados obtenidos de proteína P30 junto con la tinción Christmas Tree con el fin de obtener eficacia en cada prueba junto con protocolos adecuados, la mejor manera de mantener el líquido seminal es en refrigeración, al analizar ambas técnicas el margen de error fue del 0.5%, es decir que solo una muestra dio positividad en P30 pero no se encontraron espermatozoides, aun así se confirma la existencia de líquido seminal obteniendo de este modo resultados confiables y veraces.

## RECOMENDACIONES

- Controlar de manera efectiva los factores externos que afectan a las evidencias (temperatura y humedad), para que se mantengan las estructuras celulares y proteicas intactas y nos ayuden para un reanálisis, así se lo amerite.
- Para mejorar la conservación celular dentro de una evidencia, ésta debe tener una congelación rápida y efectiva para que se pame al mismo tiempo material extracelular e intracelular, evitando la deshidratación de las células al momento de su descongelación para el análisis, es por ello que se recomienda utilizar un procedimiento a base de nitrógeno, para evitar la muerte celular y así preservar la muestra.
- Se recomienda realizar un protocolo de preservación de evidencias, para evitar su descomposición y alteración, asegurando la justicia con la emisión de resultados confiables al momento de reabrir un caso.

## BIBLIOGRAFÍA

1. García-Moreno C, Guedes , Knerr W. WHO\_RHR\_12.37\_spa.pdf?ua=1. [Online].; 2013 [cited 2017 Diciembre 05. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98821/1/WHO\\_RHR\\_12.37\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98821/1/WHO_RHR_12.37_spa.pdf?ua=1).
2. Ferreira Salazar C, García García K, Macías Leiva L, Pérez Avellaneda A, Tomsich. Mujeres\_y\_Hombres\_del\_Ecuador\_en\_Cifras\_III.pdf. [Online].; 2010 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Libros/Socioeconomico/Mujeres\\_y\\_Hombres\\_del\\_Ecuador\\_en\\_Cifras\\_III.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Libros/Socioeconomico/Mujeres_y_Hombres_del_Ecuador_en_Cifras_III.pdf).
3. Estado FGd. El abuso sexual infantil en la mira de la Fiscalía. [Online].; 2017 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: <http://www.fiscalia.gob.ec/index.php/sala-de-prensa/boletines/67-2017/marzo-2017/628-el-abuso-sexual-infantil-en-la-mira-de-la-fiscalia>.
4. Comercio DE. En Riobamba se investigan otros casos de violencia sexual contra la mujer. [Online].; 2015 [cited 2017 Diciembre 05. Available from: <http://www.elcomercio.com/actualidad/riobamba-investigacion-violaciones-gaby-diaz.html>.
5. Estado FGd. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE BIOLOGIA FORENSE. [Online].; 2007 [cited 2017 Noviembre 21. 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).
6. Zúñiga Rocha L, González Camacho C, Ibarra González S, Becdach Izquierdo G, Falconí Arias , Rodríguez Quirola E, et al. Código Organico Integral Penal. Primera Edición ed. A GAC, editor. Quito: Gráficas Ayerve C. A.; 2014.
7. Resolución No. 0402014. REGLAMENTO DEL SISTEMA PERICIAL INTEGRAL DE LA FUNCIÓN JUDICIAL. [Online].; 2014 [cited 2017 Diciembre 20. Available from: <http://www.funcionjudicial.gob.ec/www/pdf/Reglamento%20del%20Sistema%20Pericial%20Integral%20de%20la%20Funcion%20Judicial.pdf>.
8. Mandal. Fisiología de smen. [Online].; 2013 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: [https://www.news-medical.net/health/Semen-Physiology-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Semen-Physiology-(Spanish).aspx).
9. Estevez Claver JC. Formación criminalística, enfoque pericial: algunos aspectos en la investigación científica forense. [Online].; 2008 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/rapidos2008/INF-2008-011.pdf>.
10. Dickerman Kraunick , Castro Bobadilla. Sexología forense. [Online].; 2012 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/SexologiaForense/pdf/SexologiaForense-10.pdf>.
11. Dickerman Kraunick , Castro D. Sexología Forense. [Online].; 2010 [cited 2017 Noviembre 20. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/SexologiaForense/pdf/SexologiaForense-10.pdf>.
12. Estado FGd. 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. KGaA M. Rojo nuclear sólido (C.I. 60760). 2017..

14. REPRODUCTOR AYFDA. muestra\_matronas.pdf. [Online].; 2010 [cited 2017 Noviembre 21. Available from: [http://www.um.es/anatvet/Documentos/muestra\\_matronas.pdf](http://www.um.es/anatvet/Documentos/muestra_matronas.pdf).
15. Carpio AM. bitstream/datos/2915/1/08823.pdf. [Online].; 2011 [cited 2017 Noviembre 21. Available from: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/2915/1/08823.pdf>.
16. Sánchez-Ostiz , Íñigo , Ruiz de Erenchun. E. wiki/Agravante. [Online].; 2017 [cited 2017 Noviembre 21. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Agravante>.
17. Comercio DE. Una de cada 10 mujeres en el país fue víctima de abuso sexual en su infancia o adolescencia. [Online].; 2017 [cited 2017 Diciembre 05. Available from: <http://www.elcomercio.com/tendencias/abusosexual-ninas-ecuador-cifras-unicef.html>.
18. Robertson. Ingerir semen. [Online].; 2015 [cited 2017 Diciembre 06. Available from: [https://www.news-medical.net/health/Swallowing-Semen-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Swallowing-Semen-(Spanish).aspx).
19. Silveyra J, Carreño Rios L. Colegio Libre de Estudios Universitarios. [Online].; 2006 [cited 2018 Febrero 25. Available from: <https://criminalistica.mx/descargas/documentos/pdf/TecnicasHematologiaForense.pdf>.
20. Alvear M, Blaquier J. 9500616092\_spa.pdf. [Online].; 1994 [cited 2018 Febrero 25. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39626/1/9500616092\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39626/1/9500616092_spa.pdf).
21. Ceja Heredia A, López Loeza E, Ruíz Jiménez JG. VALIDA-2. [Online].; 2011 [cited 2018 Febrero 25. Available from: <https://es.scribd.com/document/229118821/VALIDA-2>.
22. Estado FGd. Microsoft Word - Sro 318 FISCALIA NELLY FINAL. [Online].; 2014 [cited 2018 Febrero 25. Available from: [http://www.portal.dnpj.gob.ec/inicio/images/DOC\\_PUB/planificacion/registro%20oficial%20318.pdf](http://www.portal.dnpj.gob.ec/inicio/images/DOC_PUB/planificacion/registro%20oficial%20318.pdf).
23. Soto Ramos E. fcs718i. [Online].; 2014 [cited 2018 Febrero 25. Available from: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/fcs718i/doc/fcs718i.pdf>.
24. Criminalística FIdCy, González Contreras C. Federacion Internacion de Criminología y Criminalística-Publicaciones. [Online].; 2015 [cited 2018 Febrero 25. Available from: <https://www.facebook.com/CriminologiaCriminalistica/posts/652521524848533:0>.
25. Martin AE. Estudio Forense del Semen. [Online].; 2012 [cited 2018 Febrero 25. Available from: <https://es.slideshare.net/adnestelamartin/estudio-forense-del-semen>.

# ANEXOS

## Anexo1: Técnica inmunocromatografica de P30.

 Abacus Diagnostics, Inc.

### ABAcard® 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

ABAcard® 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 ABAcard® 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 ABAcard® 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

ABAcard® 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 ABAcard® 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.



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 components.
- Disposable gloves should be worn while handling kit reagents/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/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>2</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>2</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>2</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.abacad.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>2</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>2</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>2</sub> p30 Test for use in the forensic laboratory, 1998.
- (2) Kuester, J., Rothberg, D., Schwartz, E., Eustace, M., Adams, R. Validation of a commercial p30 kit (ABACard<sub>2</sub>) for forensic identification of semen, 1998.
- (3) Carradine, C.C. Evaluation of ABACard<sub>2</sub> p30 test for the identification of Semen, 1998.
- (4) Kristaly, A., Smith, D.A.S. Validation of ABACard<sub>2</sub> p30 test for the rapid forensic identification of Semen, 1999.
- (5) Silenicki, E., Pearson, C., Atkinson, C. The Use of the ABACard<sub>2</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 Aired 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, H. 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 GOT, LDH, PAP and p30 in semen stains: application to age calculation. For. Sci. Int. v 68(1), p 7-15, 1994.
- (13) Arnbruster, 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) Willott, 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>2</sub> P30  
Catalog No. 308332

**Anexo 2: Certificado de calidad de la pipeta variable de 100 a 1000 ul. 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

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

**STATUS :** PASSED Calibration Method according to ..... EN ISO 8655-6  
 Performed by ..... Incharge - Q.C.

Calibration In-charge : Mr. Mittal Shah

**Anexo 1:** Congeladora del Centro Forense Ambato



**Anexo 2:** Muestras en congelación



**Anexo 3:** Refrigeradora del Centro Forense Ambato



**Anexo 4:** Muestras de P30 en refrigeración



**Anexo 5:** Conservación a temperatura ambiente



**Anexo 6:** Muestras a temperatura ambiente



**Anexo 7:** Cassettes para derminacion de P30.



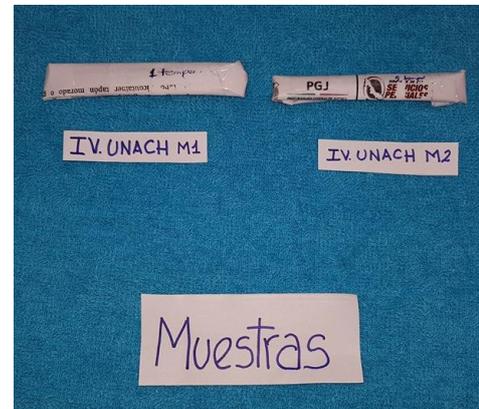
**Anexo 8:** Tubos eppendorf esteriles.



**Anexo 9:** Buffer de la técnica de P30.



**Anexo 10:** Muestras procedentes de delitos sexuales



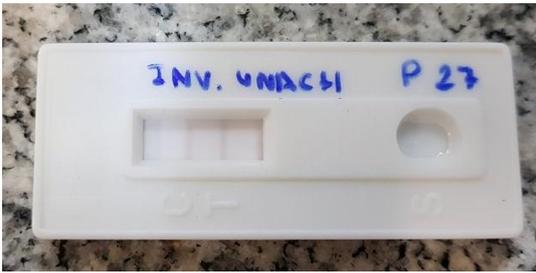
**Anexo 11:** Puntas PCR.



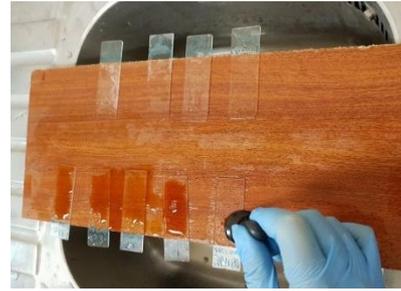
**Anexo 12:** Pipeta calibrada con certificado.



**Anexo 13:** Resultado positivo P30.



**Anexo 14:** Tinción índigo carmín (Reactivo 2).



**Anexo 15:** Preparación de Tinciones



**Anexo 16:** Tinción Rojo Rápido Nuclear



**Anexo 17:** Mezclando la tinción Indigo Picrico Carmín



**Anexo 18:** Presencia de espermatozoides.

