

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



UTILIZACION DE LA PRUEBA ANTIGENO PROSTATICO ESPECIFICO
TOTAL(PSA), PARA LA DETECCION DE SEMEN EN PRENDAS DE VESTIR
COMO EVIDENCIA EN DELITOS DE AGRESION SEXUAL

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD CURSO
DE ESPECIALIZACION

JOSE MARVIN CASTANEDA MORALES
REGINA BEATRIZ MALDONADO CHACON

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO (A) EN QUIMICA Y FARMACIA
DICIEMBRE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MAESTRO. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

MSC. ENA EDITH HERRERA SALAZAR

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORAS DE AREA

MSC. NANCY ZULEYMA GONZALEZ SOSA

LICDA. ANA LUISA CRUZ DE ALEGRIA

TUTORA

LICDA. LORENA MARGARITA RAMIREZ MERCADO

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial a:

A Dios, por guiarnos y acompañarnos a lo largo de este camino.

Licenciada Lorena Margarita Ramírez Mercado, quien fue pieza fundamental gracias a su asesoría durante el desarrollo de este trabajo, por su dedicación y disposición de tiempo, esfuerzo empleado y conocimientos brindados como docente para ayudarnos a culminar nuestra formación académica y de tal manera aprobar con éxito nuestro trabajo de graduación.

Maestra Nancy Zuleyma González Sosa por sus consejos y recomendaciones, para la realización de este trabajo, por brindarnos apoyo y motivarnos siempre a seguir adelante.

A nuestra alma mater Universidad de El Salvador y a los docentes de la Facultad de Química y Farmacia que formaron parte de nuestro aprendizaje durante toda la carrera por concedernos la oportunidad de tener una formación tanto profesional como personal.

A todas las personas que han sido luz en nuestro camino y nos han acompañado en distintas etapas de nuestra vida y que directa o indirectamente han contribuido a nuestro crecimiento.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”. Albert Einstein

José Castaneda y Regina Chacón.

DEDICATORIA

Con mucha alegría y sentimiento dedico este trabajo principalmente a:

Nuestro Padre Celestial por haberme permitido llegar hasta este momento, a mi madre y mi padre por ser los pilares en este proceso y brindarme su apoyo incondicional, aun cuando hubo días en los que les defraudé, ellos pusieron más que solo su confianza en mí, este día con este trabajo se culmina una carrera literalmente una carrera contra adversidades no solo económicas, en las que solo mis padres saben el sacrificio que tuvieron que hacer para regalarme esta herencia invaluable que es mi profesión.

José Castaneda.

DEDICATORIA

Dedico de manera especial mi trabajo de graduación a:

A Dios, por guiarme e iluminarme en cada uno de mis pasos, por no dejarme sola en los momentos de tristeza, desvelo y frustración durante toda mi vida, especialmente a lo largo de mi carrera universitaria, por permitirme culminarla y seguir bendiciéndome día a día.

María Auxiliadora y San Judas Tadeo, por escucharme e interceder por mí ante mis necesidades, brindarme la fortaleza para seguir adelante, protegerme durante todo mi trayecto y nunca olvidarse de mí.

A mi mami, Mirna Chacón por ser el pilar de mi vida, por ser una gran madre y darme su amor incondicional, además de motivarme a ser una buena persona y estudiante para dar siempre lo mejor de mí.

A mi familia, especialmente a mi tía, Estela Chacón y a mi prima Katherine Chacón, por apoyarme de manera incondicional y creer en mí.

A mi mejor amigo de la facultad, Carlos Vásquez, por ser un compañero y amigo ejemplar, por hacerme reír, apoyarme y alentarme siempre en los momentos de frustración y desvelo.

A mi novio, Amílcar Bonilla, por su amor, paciencia y apoyo incondicional en este logro y muchos otros.

Regina Chacón.

INDICE GENERAL

Resumen	
Capítulo I	10
1.0 Introducción	xi
Capítulo II	14
2.0 Objetivos	
Capítulo III	16
3.0 Marco teórico	17
3.1 Espermatología Forense	17
3.2 Breve descripción de la anatomía del aparato genital masculino humano	17
3.3. Definición y Composición del semen	17
3.4. Los Espermatozoides	19
3.5. Estudio forense de las manchas de semen	20
3.6. Exámenes espermatoológicos en personas vivas y cadáveres	29
3.7. Factores que podrían limitar la detección o recuperación de semen de la víctima de asalto sexual	31
3.8. Exámenes espermatoológicos en la escena del delito	32
3.9. Recojo de evidencias seminales	32
3.10. La Bioquímica del Antígeno específico de próstata (AEP/PSA) y sus fracciones	33
3.11. Conceptualización de agresión sexual	34
Capítulo IV	36
4.0 Diseño metodológico	37
4.1 Tipo de Estudio	37
4.2 Investigación bibliográfica	37
4.3 Desarrollo	38
4.3.1. Búsqueda del material bibliográfico para su selección.	38
4.3.2. Análisis y selección del material consultado.	39
4.3.3. Diseño de una Práctica de laboratorio	39
Capítulo V	40

5.0	Resultados y discusión de resultados	41
	Capítulo VI	48
6.0	Conclusiones	49
	Capitulo VII	50
7.0	Recomendaciones	51
	Glosario	
	Bibliografía	
	Anexos	

RESUMEN

Según el informe del año 2020 de la Fiscalía General de la República en El Salvador, referente a “Delitos contra la Libertad Sexual”, tan solo un reducido porcentaje de los casos de agresión sexual se denuncian. Ese año se registraron 2,858 casos de delitos contra la libertad sexual. A pesar de la alta incidencia a nivel mundial, muchos de estos casos quedan impunes debido a diversas circunstancias, una de ellas, la falta de pruebas.

La presente investigación tuvo como objetivo principal describir la utilidad de la prueba antígeno prostático específico total (PSA), para la detección de semen en prendas de vestir como evidencia en delitos de agresión sexual.

La metodología utilizada en esta investigación fue bibliográfica y documental, se indagó la utilidad del antígeno prostático específico y su eficiencia en la detección de semen en muestras de interés forense, en este caso prendas de vestir, adicionalmente, los factores externos que pueden limitar la detección de semen por dicho método de análisis, finalmente, se diseñó una práctica de laboratorio para la detección de semen en prendas de vestir, como producto final del curso de especialización “Análisis químico aplicado a la Investigación Criminal” de la Facultad de Química y Farmacia, el cual se ejecutó en un período de 6 meses bajo modalidad a distancia.

De manera que, el presente trabajo puede emplearse en futuras investigaciones relacionadas a la búsqueda de nuevas técnicas de análisis forense en indicios biológicos, y contribuir a la investigación nacional, asimismo, a la formación de los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia que cursen la asignatura de Química Forense y Toxicología establecida en el pensum académico, a fin de, completar de manera práctica los conocimientos teóricos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La agresión sexual es uno de los delitos con mayor incidencia mundial, en el que, se atenta contra la libertad sexual, y como todo delito, el agresor merece ser castigado como la ley ordena.

En este tipo de delitos, el elemento crucial para llevar a cabo la investigación científica forense es el semen, ya que, provee la evidencia del contacto sexual con la víctima. Dicho fluido biológico puede encontrarse en distintas superficies de una escena del crimen, unas de ellas son las prendas de vestir, cuya complejidad de análisis se determina por factores propios del material y externos como el tiempo transcurrido desde el hecho delictivo, puesto que, se trata de muestras biológicas que son degradadas fácilmente, así sea porque han sufrido algún tipo de alteración a causa de los factores ambientales a los que se expone la muestra, o por otros materiales biológicos que regularmente están presentes en este tipo de evidencia como sangre, orina, secreción vaginal y heces fecales.

El descubrimiento de semen como indicio en manchas seminales a poco tiempo de haberse cometido el delito suele ser fácilmente detectable, pero su hallazgo se obstaculiza con el paso del tiempo, debido a la exposición a condiciones ambientales desfavorables y que generalmente este indicio involucra una mezcla de fluidos tanto de la víctima como del agresor, además, se debe tener en cuenta que, en la mayoría de casos la recolección del indicio biológico se efectúa varias horas después de ocurrido el hecho delictivo, por otro lado, considerando los casos en que la víctima ha fallecido y el cuerpo ya se encuentra en estado de putrefacción, el diagnóstico de la presencia o ausencia de semen se complica, esto a causa de, la alta contaminación fúngica y a la degradación celular provocada por la autólisis del cuerpo mismo.

Por lo anterior, surge la necesidad de pruebas específicas desarrolladas para identificar marcadores bioquímicos presentes en el plasma seminal, una de estas pruebas es el ensayo de antígeno prostático específico (PSA), que permite detectar trazas del fluido biológico, en este caso semen encontrado en superficies como prendas de vestir, las cuales juegan un papel sumamente relevante, ya que, en estas pueden quedar restos del fluido biológico del agresor, sin embargo, como se mencionó antes, este fluido puede mezclarse con el de la víctima, y, por lo tanto, confundirse, de modo que, la determinación del PSA, puede realizarse como una prueba de carácter confirmatorio, puesto que, al ser esta específico de la próstata, su descubrimiento es suficiente para confirmar la presencia de semen.

Por consiguiente, en el presente trabajo se propone el método de análisis por Antígeno Prostático Específico (PSA), para la detección de semen en prendas de vestir, como marcador bioquímico en la evidencia de delitos por agresión sexual, bajo la premisa que el Antígeno Prostático Específico, es una proteína solamente secretada en la próstata, es decir, por varones y que puede ser detectado en concentraciones mínimas y en muestras de semen provenientes de varones vasectomizados y azoospermicos, además de no presentar interferencias por ninguno de los materiales biológicos que regularmente están presentes en una escena del crimen.

Anteriormente, se han realizado estudios internacionales sobre validación del método de detección de antígeno prostático específico (PSA), por inmunocromatografía (Organics) aplicado a líquido seminal presente en manchas secas y escobillones, en el cual se validó la prueba inmunocromatográfica para la detección de PSA en muestras forenses.

Desafortunadamente a nivel nacional no se encuentran estudios referentes a dicha técnica.

Así pues, la presente investigación recolecta información de diferentes fuentes bibliográficas para la construcción de un marco teórico sólido que sustenta con base científica la utilidad de la técnica en el análisis forense de antígeno prostático específico y su eficiencia en la detección de semen, en casos de abuso sexual donde no pueden encontrarse espermatozoides por métodos tradicionales, adicionalmente, se presentan los factores externos que pueden limitar la detección de semen por dicho método, finalmente se diseña una práctica de laboratorio para detectar semen en prendas de vestir, siendo esta producto final del curso de especialización “Análisis químico aplicado a la Investigación Criminal” de la Facultad de Química y Farmacia, que se ejecutó en un período de 6 meses bajo modalidad a distancia.

La práctica de laboratorio diseñada, permitirá a los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia que cursen la asignatura de Química Forense y Toxicología profundizar en la temática y complementar de manera práctica los conocimientos teóricos relacionados con el análisis forense de indicios biológicos, en casos de crímenes por abuso sexual. Asimismo, favorecerá a futuras investigaciones relacionadas con la temática, ya que, ayudará a comprender los fundamentos y la utilidad de dicha técnica.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Proponer la utilización de la prueba antígeno prostático específico total (PSA), para la detección de semen en prendas de vestir como evidencia en delitos de agresión sexual.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Buscar fuentes bibliográficas, a fin de, fundamentar la efectividad del método (PSA) para detectar la presencia de semen en prendas de vestir.

2.2.2 Recolectar la información necesaria para identificar los factores externos que pueden limitar la detección de semen por el método (PSA) en las muestras biológicas presentes en prendas de vestir.

2.2.3 Diseñar una práctica de laboratorio utilizando el método (PSA), para detectar presencia de semen en prendas de vestir.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Espermatología Forense

Es una rama de la biología forense que se encarga del estudio minucioso y ordenado de los componentes del semen o esperma y que permita obtener información que coadyuve al esclarecimiento de procesos de investigación en casos relacionados con delitos sexuales¹.

3.2 Breve descripción de la anatomía del aparato genital masculino humano

El aparato reproductor masculino está formado por varios órganos que según su función se podrían clasificar en cuatro grupos:

Dos testículos los cuales tienen una doble función, por una parte, producen los espermatozoides mediante un proceso llamado espermatogénesis y por otra ejercen una importante regulación endocrina, tanto a nivel reproductor como sobre otros órganos y funciones de nuestro cuerpo. Las vías seminales, que también son dobles hasta su conexión con la próstata, transportan los espermatozoides a lo largo del sistema reproductor. Las glándulas accesorias las cuales aportan una serie de sustancias vitales para la función reproductora porque forman el líquido seminal, y además tienen una función nutritiva o reguladora. El pene, deposita el semen en la vagina².

3.3. Definición y Composición del semen

El término semen, esperma o líquido seminal, son palabras sinónimas, que tienen sus raíces tanto en el griego, como en el latín y que significan “semilla”. El semen es un líquido filante, cremoso, de color opalino o ligeramente amarillo, que tiende a amarillo verdoso con el paso del tiempo y presenta un olor sui géneris y un pH de 7,2 a 7,3. Este fluido contiene a los espermatozoides y se constituye en el producto de la secreción testicular y de las glándulas anexas (aparato genital de animales machos) y que aparecen después de la madurez sexual. El semen

puede ser separado por centrifugación, obteniéndose los espermatozoides y el plasma seminal.

Entre los componentes no proteicos más importantes se puede mencionar:

- Cloruro de sodio
- Dióxido de carbono
- Fósforo inorgánico
- Fósforo ácido soluble
- Fósforo unido a la espermina y lecitina
- Calcio, sodio y potasio
- Glucosa, fructosa, manitol, etc.
- Urea
- Ácido láctico, ascórbico y cítrico
- Colesterol.

El plasma seminal contiene elevadas cantidades de sustancias fosforadas y entre ellas, tenemos el Difosfato de Espermina de origen prostático, así como la espermidina, que es un producto del hidrólisis parcial de la espermina y a la cual se le atribuye como fuente del olor sui géneris del esperma¹.

El esperma contiene entre 1,58 a 1,8 mg / 100 ml de proteínas y entre estos componentes proteicos, tenemos pequeñas cantidades de globulinas, bastante albúmina, enzimas como proteasas no coagulables, amilasa, una tromboquinasa, fosfatasa alcalina y la de mayor valor pericial, como es la fosfatasa ácida prostática (PAS), el semen no contiene hormonas sexuales.

El producto de una eyaculación normal oscila entre 1,5 y 6 ml. Llámese hipospermia, cuando el volumen es menor a 1,5 ml. y aspermia, la falta de semen. Se sabe que el mayor aporte en volumen es por parte de las glándulas anexas, especialmente por la próstata y vesículas seminales. Este volumen puede ser afectado por el intervalo de tiempo transcurrido desde la última vez que se eyaculó, la actividad metabólica de las glándulas y la presencia o ausencia de obstrucción parcial del ducto sexual.

El esperma no es emitido en forma homogénea, sino que comprende tres porciones de distinta composición: Primero, la glándula de Cowper por estímulo sexual, emite una sustancia de naturaleza albuminoide, viscosa, transparente, alcalina de pH 8,4 para eliminar la acidez de la uretra, luego, la fracción prostática rica en fosfatasa ácida y finalmente, los espermatozoides, junto con el líquido segregado por las vesículas seminales¹.

3.4. Los Espermatozoides

Citados por primera vez por Leeuwenhoek, en 1677. Los espermatozoides son células móviles, que constan de una cabeza, cuello, cuerpo y cola. Se desarrollan en los tubos seminíferos (unidad estructural testicular), partiendo de las espermatogonias pasando por los espermatocitos primarios, secundarios, espermátides y finalmente, los espermatozoides y conforman aproximadamente 10 a 25 % del volumen total del semen, con una densidad normal entre 60 a 100 millones por mililitro de semen. Cuando la concentración se halla en cantidades menores a 50 millones se habla de una oligozoospermia, cuando el semen no contiene espermatozoides se califica como azoospermia. Los espermatozoides tienen una apariencia característica y distintiva cuando son observados bajo un microscopio. Ellos tienen aproximadamente 50 a 60 micras de longitud y comprenden una cabeza ovoide y flatenada de 4,6 - 2,6 - 1,5 micras) y una cola de 50 micras de longitud, con una estructura de unión entre la cola y la cabeza, denominada, cuello (rica en mitocondrias), Las manchas secas frecuentemente presentan cabezas de espermatozoides sin colas. La cabeza, es una estructura que fundamentalmente está comprendida de un núcleo rodeado de una capa fina y transparente de citoplasma, conteniendo en la parte anterior, una vesícula secretora conocida como acrosoma. Esta es una estructura parecida a un capuchón y puede ser teñido para diferenciarlo. Los espermatozoides son la principal fuente de ADN en el semen¹.

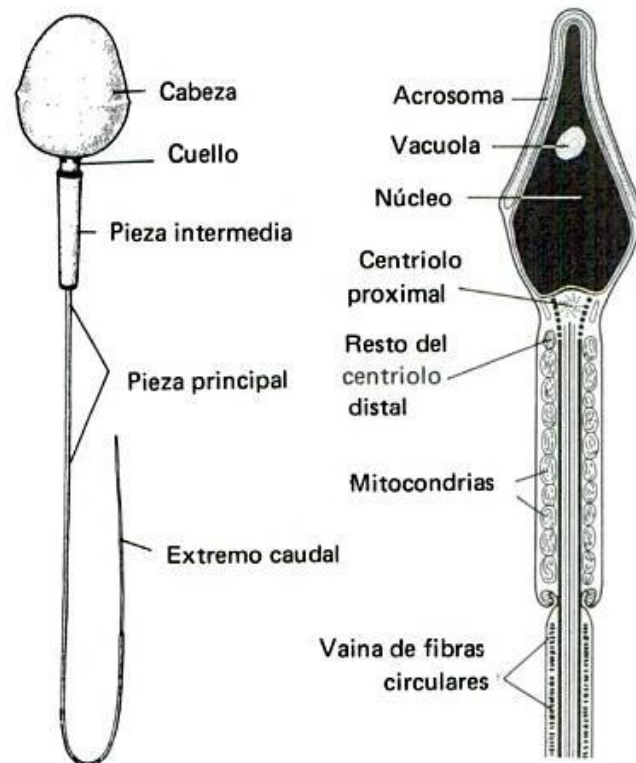


Figura No 1. Morfología del espermatozoide⁷.

3.5. Estudio forense de las manchas de semen

Las manchas de semen pueden estudiarse tanto desde el punto de vista reconstructor, como identificador.

- Como Elemento Reconstructor:
- Características de las Manchas de Semen

Para realizar el estudio del espermatozoide o semen, deben conocerse primeramente sus características macroscópicas: El color y el aspecto del estado físico, se presenta como un líquido filante de color blanco lechoso o ligeramente amarillento, que al desecarse o envejecer sobre el soporte, se convierte en amarillo franco y aun en amarillo verdoso. Seco sobre soportes, depende su aspecto y color del soporte mismo. Así mismo, es importante conocer el olor, que en la especie humana recuerda al de las flores de castaño comestible o a la lejía.

A la palpación, en telas con manchas seminales secas, dan una sensación de almidonado o acartonado¹.

- Tipos de Soporte

En los soportes absorbentes tales como telas de prendas de vestir y papel higiénico, toma el aspecto de “mapa geográfico”, sobre la lana y otros soportes no absorbentes, las manchas seminales pierden el aspecto de mapa geográfico y producen rastros como las que dejan los caracoles al caminar sobre una superficie, siendo a veces escamoso. En soportes impermeables tales como el acero, la madera, plástico, etc., las manchas seminales forman una película adherente como las que dejan los preparados a base de laca o esmaltes para las uñas, igual sucede cuando queda sobre la piel, de la cual se desprende sobre una película escamosa.

- Tipos de manchas seminales

Así como el caso de las manchas sanguíneas, el estudio de la morfología de las manchas seminales, permitirá la reconstrucción de los hechos. Las manchas seminales pueden ser circulares o alargadas, regulares o irregulares según sus contornos, puede haber manchas tipo rozamiento, escurrimiento, contacto y también goteo. Si la víctima se encontraba de pie y relativamente inmóvil, se hallarán manchas tipo goteo; si la eyaculación ha sido fuera de los genitales, con movimientos de lucha u otra causa, se obtendrán manchas alargadas o escurrimiento, con indicación de dirección de movimiento.

Si se encuentra semen con huellas labiales o “rouge” en una prenda de vestir u otros soportes, se puede deducir que los rastros pertenecen a una persona con desviaciones sexuales. En caso de manchas de semen con materias fecales pueden servir para indicarnos actos de pederastia y sodomía. En el caso de que se encuentren en regiones de las prendas de vestir cercanas al rostro (cuello de camisa, parte delantera de poleras o camisetas, chompas, etc.) pueden ser indicativos de sexo oral¹.

Las manchas secas de semen sobre ropas y prendas de cama, pueden exhibir alguno o todos los componentes del semen, meses o aún años después de su deposición. El lavado tenderá a remover cualquier material seminal, aunque ha habido reportes de persistencia de espermatozoides después del lavado.

- Determinación de la Cantidad de la Semen en la Mancha

Este problema fue resuelto a través de la cuantificación del calcio en la mancha, siendo de gran valor pericial a la hora de verificar la sospecha de varios implicados en la agresión sexual y que la cantidad de esperma vertido proceda de más de una persona y que estos no han podido ser discriminados por métodos serológicos convencionales.

El calcio es un elemento de absoluta constancia en el esperma humano, se encuentra en la proporción de 25 mg por cada 100 ml de esperma. Existen varias técnicas, desde la medición instrumental (espectrofotometría de absorción atómica), hasta métodos menos sofisticados, pero no menos precisos, como la inducción de formación de óxido cálcico. Debe tomarse en cuenta que una descarga de eyaculación varía entre 1,5 a 6 ml.

- Antigüedad de la mancha de Esperma

Se había mencionado como un componente normal del plasma seminal a un fosfolípido conocido como lecitina, el cual produce por hidrólisis, la colina, bajo la premisa que, a mayor tiempo transcurrido, habrá menor cantidad de lecitina y mayor cantidad de colina, se medirá por titulación la cantidad de Iodo absorbido por la colina¹.

- Como elemento identificador:

Es el examen en el laboratorio, donde se aplicarán diferentes pruebas, al igual que en manchas de sangre, siguiendo la misma marcha analítica, ya sea determinando, la naturaleza biológica de las manchas seminales, su origen humano, la identificación de anomalías en la morfología de las células espermáticas de los espermatozoides o agentes extraños, como parásitos, con

fines de identificación y la tipificación por antígenos secretores y grupos isoenzimáticos.

– Exámenes de Descarte o Presuntivos

Estos exámenes presuntivos ayudan a ubicar los lugares potencialmente positivos para semen. Los test presuntivos más comúnmente usados para semen, pueden darse a través de la fluorescencia, la formación de microcristales, ya sea evidenciando la presencia de espermina o la colina y métodos colorimétricos como el test de la brentamina, que detecta la presencia de la fosfatasa ácida prostática (SAP). Estos ensayos solo son cualitativos¹.

– Métodos Físicos

Cuando se deben evaluar muchos materiales o superficies extensas, es útil recurrir a la fluorescencia natural del esperma cuando es expuesto a una fuente de luz ultravioleta de onda corta, de 254 nm de longitud (lámpara de Wood), exponiendo las manchas de semen a la luz ultravioleta, están emiten una fluorescencia de color blanco – amarillenta.

Esta reacción de fluorescencia está relacionada con la elevada proporción de sustancias fosforadas contenidas en el plasma seminal, dentro de las cuales se encuentra el Difosfato de espermina, sustancia responsable de la fluorescencia de la mancha seminal, la que es independiente de la presencia de espermatozoides¹.

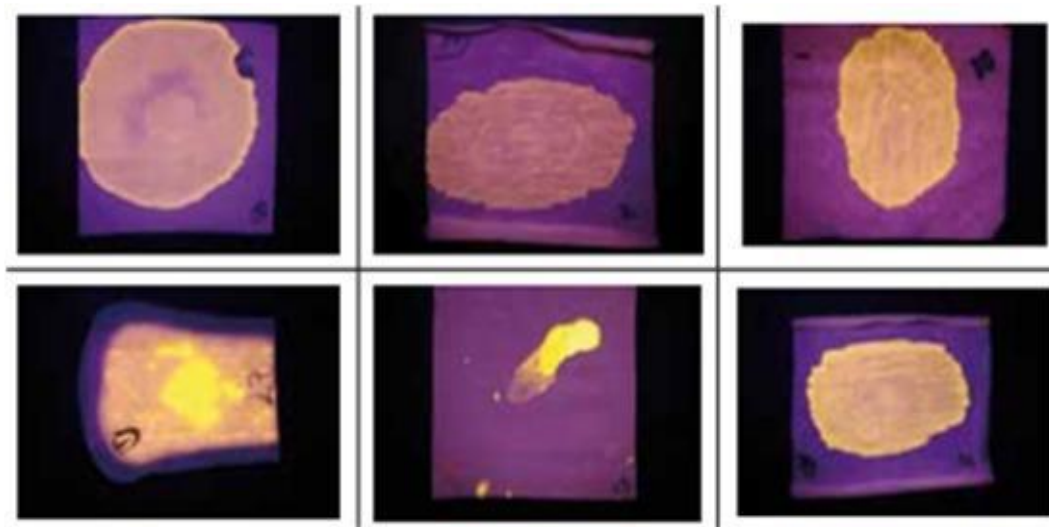


Figura No 2. Observación de fluidos biológicos mediante Luz UV⁸.

- Métodos Microcristalográficos
- La prueba de Barberio, está basada en la formación de cristales fosfato o picrato de espermina, aplicada a extractos de manchas sospechosas que reaccionarán con el anión correspondiente.
- La prueba de Florence, detecta la presencia de cristales de peryoduro de colina, cuando el extracto de semen es tratado con una solución de yodo en ioduro de potasio.
- Método Colorimétrico

El test de la fosfatasa ácida (SAP), está muy bien documentado como un ensayo presuntivo, para determinar la presencia de semen. Una forma rápida para evidenciar la presencia de fosfatasa ácida, se da a través de reacciones de cambio de color para resultados positivos, con sales Diazotadas, como la Brentamina. La SAP es una enzima presente en altas concentraciones en el semen, clasificada como una fosfohidrolasa no específica, que cataliza una variedad de fosfatos orgánicos, incluyendo el p-nitrofenil, naftil- y timolftaleina monofosfato¹.

Como indica su nombre, esta enzima actúa en medio ácido a un pH de 4.9 - 5.5. Aunque la SAP es una prueba muy sensible, esta no es muy específica para semen, debido a su presencia en otros tipos de fluidos o tejidos, incluyendo particularmente los fluidos vaginales.

El interés forense de la evaluación de fosfatasa ácida como evidencia de delitos de agresión sexual, está basado en el hecho de que la actividad de la fosfatasa ácida en el semen humano es 500 a 1000 veces más grande que en cualquier otro fluido corporal normal. Desafortunadamente, el uso de la fosfatasa ácida como un marcador o indicador de semen es afectado, porque la vagina es también una fuente del mismo tipo de fosfatasa ácida. Su aplicación en la diferenciación de semen azoospérmico en secreciones vaginales, es de gran interés forense.

Un número de factores, sin embargo, complica la interpretación en muchos casos. La variación en los niveles básicos endógenos de la fosfatasa ácida vaginal, niveles presentes no sólo entre individuos, sino también a nivel de un solo individuo, se puede ver afectada por factores como el embarazo, el ciclo menstrual, la vaginosis, uso de ciertos productos higiénicos u otros contaminantes, produciendo en muchos casos, elevados valores de fosfatasa ácida endovaginal.

La actividad medible de la fosfatasa ácida en muestras vaginales después de la deposición del semen, declina por varios factores, entre los más importantes están, el drenaje y la dilución por las secreciones vaginales. El porcentaje o índice de declinación es completamente medible. Existe poco consenso en la literatura con respecto a un nivel confiable, que permita separar la fosfatasa ácida de origen endovaginal, con la de origen seminal¹.

Existe también desacuerdo sobre el tiempo en el cual el análisis de la fosfatasa ácida es usado para propósitos forenses después de su deposición. Varios reportes de tiempos tan cortos como 3 horas, hasta tiempos de 72 horas. Porque todas las variables fisiológicas, temporales, cuantitativas y metodológicas,

potencialmente afectan la medición de los valores, la interpretación de una muestra específica debería estar en el contexto de una base de datos y experiencia del laboratorio forense en la performance de test. Se reportaron los siguientes valores de persistencia de la fosfatasa ácida:

- Siete (7) días: en secreción vaginal
 - Veinticuatro (24) horas: en secreción rectal
 - Treinta y seis (36) horas: en la boca
 - Un (01) mes: en cadáver conservado a baja temperatura.
- Pruebas confirmatorias

La presencia de semen puede ser confirmada microscópicamente, por la presencia de espermatozoides, o por la presencia de la proteína p30, o antígeno específico del semen (PSA).

- Observación Microscopia de Espermatozoides.

El espermatozoide no móvil, pero morfológicamente intacto, puede ser visto sobre una lámina montada. Comúnmente se emplean láminas teñidas, utilizando Hematoxilinaeosina, Papanicolaou y Cristal violeta; observadas al microscopio a 400 y 1000 aumentos. Algunos laboratorios reportan desde pocos (menos de 5 espermatozoides por campo) hasta 4+ (muchos en cada campo). Si la muestra ha sido contaminada por otros fluidos corporales (saliva, secreción vaginal, etc.), células epiteliales y restos celulares, hacen la identificación de los espermatozoides más difícil.

Se puede intentar una degradación de las células epiteliales y restos celulares, mediante tratamiento con Proteinasa K y Dodecil sulfato de sodio (SDS), antes de la tinción, o utilizar colorantes específicos para cabezas de espermatozoides como el Anaranjado de Acridina, pero el cual requiere de la observación de un microscopio de fluorescencia.

En la observación microscópica, es importante confirmar la presencia de esperma mencionando si solo hay espermatozoides con cabeza sin cola, o cuando estos presentan cola o si existe una mezcla de ambos¹.

En la actualidad, la técnica microscópica más empleada para la observación de espermatozoides, es la técnica denominada “tinción de árbol de navidad”, una tinción de contraste que utiliza dos colorantes que por sus propiedades químicas y afinidad por las células, permite colorear las cabezas de los espermatozoides de un color rojo brillante no uniforme y el resto de la célula de color verde, logrando con esto, bajo observación al microscopio, identificar los espermatozoides por color y forma, que es característica y única entre las células encontradas en la placa realizada y analizada. Estas células pueden ser teñidas con el colorante nuclear fast red y ácido pícrico - indigocarmín, componentes de esta técnica. Para la aplicación de esta técnica, es necesario contar con un control positivo de espermatozoides y registrar fotográficamente todas las observaciones.

– Detección de la p30

La proteína P30 o antígeno específico de próstata (PSA), es una proteína que es sintetizada exclusivamente en la próstata y es un importante indicador clínico de cáncer a la próstata. Su rango normal en semen esta entre 300 - 4200 g/ml, con un promedio de 1200 g/ml. Esta proteína no debería estar presente en otros fluidos corporales o tejidos, en casos normales¹.

Sin embargo, esta proteína también se encuentra en casos de cáncer de seno, pulmón y cáncer uterino y podría estar funcionando como una proteína antiangiogénica endógena. Anticuerpos comerciales para PSA, son ya viables técnicas estándar de inmunohistoquímica y pueden ser aplicados para detectarlo, incluyendo inmunolectroforesis cruzada, inmunocromatografía, inmunoensayo con enzima conjugada (ELISA) o simple difusión doble. Las técnicas de inmunocromatografía y ELISA, son muy sensibles para diluciones de semen de 1 en 10⁵ - 10⁶ (por ej. 1 ng/ml aproximadamente) y deben ser tomadas con mucho cuidado las interpretaciones de resultados débiles. Por ejemplo, puede ser posible obtener reacciones falso positivas de orina post eyaculación y orina

de adultos masculinos, debido a que el PSA, está presente en niveles promedio de 260 ng/ml en ella.

- Tipificación de las manchas de semen por métodos serológicos.

Las propiedades aglutinantes grupo específicas no existen solamente en la sangre, se hallan también en la mayor parte de los fluidos biológicos. Un alto porcentaje de individuos, alrededor del 80 %, presenta antígenos secretados de los grupos del sistema ABO en otros fluidos biológicos y que no están unidos a membranas celulares, además de su sangre, a los cuales se les denomina secretores y no secretores, que no presenta antígenos del grupo ABO en sus líquidos orgánicos, alrededor del 20 % presenta esta característica.

Se utilizan los mismos métodos de que en sangre (absorción-elusión o absorción inhibición), con la variante de además de utilizar una aglutinina anti-O o anti-H, para no confundir la aglutinación negativa con un no secretor, para lo cual se recurre lectina de origen vegetal, extraída del *Ulex europaeus* L, que tiene la capacidad de aglutinar hematíes del grupo "O".

- Por Enzimas Polimórficas o Isoenzimas.

En este caso, se usan como marcadores genéticos las variantes isomórficas de las enzimas presentes en el semen y se evidencian evaluando su desplazamiento en un campo electromagnético (electroforesis), la enzima más estudiada es la Fosfoglucomutasa (PGM), una enzima que interviene en la vía glicolítica, la cual presenta las isoformas PGM 1-1 (57,0 %), PGM 2-2 (35,7 %) y la PGM 2-1 (7,3 %)¹.

- Análisis de PSA por medio de anticuerpos monoclonales.

En la primera fase, se inocula a un ratón el antígeno contra el que se desean producir los anticuerpos monoclonales (en este caso el PSA), hasta conseguir una buena inmunización. A continuación, se extrae el bazo del animal inmunizado y se fusiona con células de mieloma para formar los hibridomas que se seleccionarán en virtud del anticuerpo producido³.

Etapas de producción de Hibridomas

- Obtención del Antígeno
- Inmunización
- Fusión
- Restricción del crecimiento de híbridos formados
- Selección de los hibridomas positivos
- Clonaje y estabilización
- Caracterización

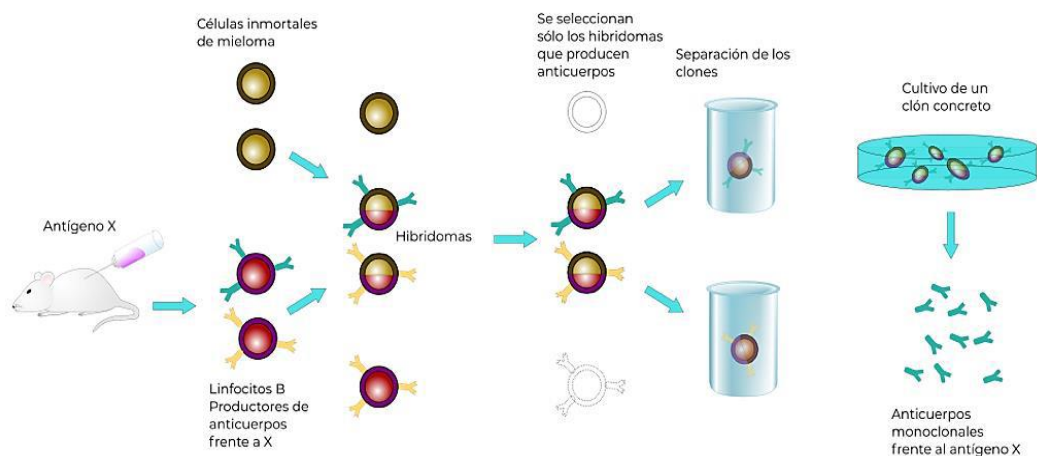


Figura No 3. Esquema de producción de anticuerpos monoclonales⁹.

3.6. Exámenes espermatoológicos en personas vivas y cadáveres

El examen sobre la víctima y el agresor, deberá realizarse lo más pronto posible, puesto que los vestigios pueden desaparecer rápidamente en el caso de lavados. La 32 persistencia postcoital en el conducto vaginal es un asunto diferente y la estabilidad diferencial de p30, SAP y espermatozoides puede ser usado para determinar cuánto tiempo ha pasado desde el último acto sexual coital.

El semen es eliminado en la vagina de la víctima debido al drenaje, dilución con fluido vaginal y fagocitosis de espermatozoides por linfocitos neutrófilos y células monocucleares, sin embargo, niveles significantes de p30 tienden a perderse dentro de las 24 horas de deposición. dentro de la cámara vaginal, SAP es normalmente eliminado entre las 48 horas postcoito y los espermatozoides, no persisten normalmente después de las 72 horas.

En individuos fallecidos, los componentes del semen pueden permanecer varios días, dependiendo de las condiciones medioambientales y el grado de descomposición de los tejidos corporales.

Muy pocos trabajos han sido publicados acerca de la recuperación postmortem de semen de víctimas de violación - homicidio. Un reporte encontró espermatozoides intactos en la vagina de una víctima de violación y homicidio, quién había sido asesinada hace 16 días. Un reporte más reciente describe la recuperación de espermatozoides intactos de la vagina de una víctima de homicidio a los 34 días postmortem. Esta víctima tenía también p30 detectable en el hisopado vaginal.

Ninguno de estos reportes fue validado por ningún otro reporte con relación al intervalo de tiempo entre la deposición de semen y muerte. Pocos reportes han sido publicados describiendo la recuperación de esperma de cuerpos de cadáveres. En ninguno hubo un reporte de agresión sexual, pero se tomaron las muestras por precaución. Por consiguiente, hay poca o nula información aprovechable acerca del tiempo de deposición relativa al tiempo de muerte.

Los reportes de tiempos más prolongados de recuperación de espermatozoides en muestra vaginales fueron de 3 a 4 meses. Un reporte de recuperación de semen de un cuerpo sumergido en agua durante 2.5 semanas. Un cuerpo momificado arrojó esperma vaginal 5 a 6 meses después de la muerte. Y reportes de recuperación de semen en el hisopado bucal fue positivo después de 4 días después de la muerte¹.

3.7. Factores que podrían limitar la detección o recuperación de semen de la víctima de asalto sexual

La no recuperación de los componentes seminales, puede deberse a una disfunción sexual en agresor, porque este usó un condón, por la demora en el tiempo transcurrido entre el momento de la violación y el momento de la toma de muestras, siendo los factores más críticos, el drenaje del contenido vaginal, degradación de las secreciones seminales, dilución por componentes endógenos, higiene de la víctima (duchas, baño, gárgaras, etc.), actividad fisiológica (micción, defecación y menstruación).

La ausencia de espermatozoides, también puede deberse a espermatogénesis dañada o debilitada, ya sea por una aplasia/hipoplasia germinal (detención del desarrollo de un órgano o tejido después del nacimiento), deficiencia hormonal (pituitaria, tiroides y gónadas), irradiación testicular, por drogas y toxinas, neoplasias, varicocele, infecciones (paperas, tuberculosis, gonorrea), elevada temperatura escrotal, alcoholismo crónico, vaciamiento de los depósitos de semen (frecuente eyaculación podría crear una azoospermia pasajera), liberación defectuosa de semen (vasectomía, trauma, anomalías congénitas). Para estos exámenes se buscará semen, sangre, cabellos, pelos en los órganos genitales principalmente, así como en otras partes del cuerpo. También se examinarán las ropas exteriores tanto de la víctima, como del agresor, para determinar su posición, rastros de violencia, forma y situación de las manchas.

En casos de detección de semen en hisopados de secreción anal, estos deben ser interpretados cuidadosamente. El drenaje del material vaginal podría contaminar el área anal¹.

La recuperación de espermatozoides de la boca es generalmente escasa. Se puede hacer el análisis en una muestra de saliva expectorada o hisopado de la mucosa bucal.

Los exámenes practicados son los siguientes: Secreción vaginal (en mujeres), Lavado balano prepucial (en hombres), Hisopado rectal (En casos de agresión sexual contra natura), Examen de uñas (uncológico) búsqueda de restos de tejido orgánicos producto de arañazos al agresor sexual. Examen de vellos púbicos (búsqueda de vellos arrancados en el canal vaginal, vellos sueltos al peinado y arrancados para comparación)¹.

3.8. Exámenes espermátológicos en la escena del delito

El procedimiento es el mismo que en casos de manchas hemáticas, no debiendo omitirse la inspección en camas, sillones, alfombras y otros lugares donde pudo haberse llevado a cabo el acto sexual. También revisar toallas, pañuelos, papeles higiénicos y otros soportes que puedan haber servido para limpiar los órganos genitales después del acto sexual. Igualmente debe buscarse cuidadosamente en los lavatorios, sanitarios, para detectar restos seminales. En lugares abiertos o a la intemperie, lo mismo que en el caso de sangre, deben buscarse manchas espermáticas sobre las hierbas, tierra, arbustos, piedras, troncos y hojas caídas¹.

3.9. Recojo de evidencias seminales

- En materiales porosos o absorbentes, se presentan de color grisáceo, que cuando envejecen se tornan amarillentos, presentan bordes irregulares (a manera de mapa geográfico) y si el soporte es flexible adquieren una consistencia apergaminada o acartonada al tacto y en lo posible se deberán remitir con su soporte o en caso contrario, se recogerán las muestras con ayuda de hisopos de algodón estéril, empapados en agua destilada y luego secados al ambiente.
- En materiales compactos, no absorbentes, dejan un depósito constituido por una película de escamas brillosas - costrosas, en estos casos se pueden raspar y retirarlos de la superficie sobre la cual están adheridos y guardarlos en sobres de papel nuevo y limpio.

- En la piel, forma débiles películas brillantes de aspecto barnizado, las cuales pueden ser retiradas con una pinza limpia o raspadas con un bisturí nuevo y limpio y guardados en sobres de papel nuevos y limpios.
- Las muestras que deben enviarse para estudio, son:
 - Prendas de vestir de la víctima
 - Prendas de vestir del sospechoso o persona inculpada
 - Prendas de cama
 - Hisopo o líquidos del LAVADO VAGINAL, RECTAL O BUCAL (en el caso de la persona de sexo femenino), o en su defecto, solicitar examen bio-forense en la persona, para la toma de la muestra adecuada.
 - Hisopo o líquidos del LAVADO BALANO PREPUCIAL O RECTAL (en el caso de la persona de sexo masculino), o en su defecto, solicitar examen bio-forense en la persona, para la toma de la muestra adecuada.
 - Condones, con datos referentes a donde se los encontró, condiciones de recolección y marca.
 - Papel higiénico, que hayan sido utilizados luego del delito.
- Para la remisión de muestras:

Todos los indicios deben embalarse secos, para evitar su descomposición o detrimento. Deben tener un embalaje de papel, en el cual se incluya un sólo indicio, para prevenir la contaminación por contacto con otros indicios¹.

3.10. La Bioquímica del Antígeno específico de próstata (AEP/PSA) y sus fracciones

El antígeno específico de próstata (AEP) por su abreviatura en español o PSA por su abreviatura en inglés de prostate specific antigen es una kallikreína que está entre los varios tipos de sustancias que secreta la próstata en su función como glándula accesoria de la reproducción.

En el semen actúa como una proteasa con preferencia desnaturalizante sobre las semenogelinas, las proteínas procoagulantes del semen producidas en la vesícula seminal, pero que como cualquier proteasa tiene un potencial adicional

para metabolizar cualquier proteína. Es por esa acción destructora que la naturaleza toma todas las precauciones para que el AEP proteasa tenga un período de actividad efímero y una serie de fracciones clivadas o desactivadas que explican en su conjunto los porcentajes en plasma del antígeno total y libre en el paciente normal y con patologías.

El AEP puede dividirse de una manera simple en dos tipos básicos: activo e inactivo, o bien libre y complejo. Hacia el futuro puede esperarse que el uso del AEP como marcador de cáncer pueda refinarse en sensibilidad y especificidad con el uso de fracciones que se relacionen matemáticamente y además con el uso de otros tipos de antígenos como el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, prostate specific membrane antigen) y el antígeno de células madre de próstata (PSCA, prostate stem cell antigen)⁴.

3.11. Conceptualización de agresión sexual

La Organización Mundial de la Salud define la violencia sexual como "todo acto sexual, la tentativa de consumar un acto sexual, los comentarios o insinuaciones sexuales no deseados, o las acciones para comercializar o utilizar de cualquier otro modo la sexualidad de una persona mediante coacción por otra persona, independientemente de la relación de ésta con la víctima, en cualquier ámbito, incluidos el hogar y el lugar de trabajo"

La coacción puede abarcar:

- Uso de grados variables de fuerza
- Intimidación psicológica
- Extorsión
- Amenazas (por ejemplo, de daño físico o de no obtener un trabajo o una calificación, etc.)

También puede haber violencia sexual si la persona no está en condiciones de dar su consentimiento, por ejemplo, cuando está ebria, bajo los efectos de un estupefaciente, dormida o mentalmente incapacitada.

La definición de la OMS es muy amplia, pero también existen definiciones más circunscritas. Por ejemplo, para fines de investigación algunas definiciones de violencia sexual se limitan a los actos que incluyen la fuerza o la amenaza de violencia física.

El Estudio multipaís de la OMS definió la violencia sexual como actos en los cuales una mujer:

- Fue forzada físicamente a tener relaciones sexuales en contra de su voluntad.
- Tuvo relaciones sexuales contra su voluntad por temor a lo que pudiera hacer su pareja
- Fue obligada a realizar un acto sexual que consideraba degradante o humillante⁵.

El abuso sexual es definido como cualquier actividad sexual entre dos o más personas sin consentimiento de una. El abuso sexual puede producirse entre adultos, de un adulto a un menor o incluso entre menores. Como actividad sexual se incluye: Cualquier tipo de penetración, roces o caricias de órganos genitales en contra de la voluntad (por lo tanto, esto puede ser acoso), o tocamiento de los órganos genitales del abusador. Cualquier acción que incite al menor a presenciar contenido sexual impropio como por ejemplo observar al adulto desnudo o mientras mantiene relaciones sexuales con otras personas, ver material pornográfico o asistir a conversaciones de contenido sexual. Tipos de abuso sexual son la violación, que es considerada delito sin importar la edad de la víctima, y el estupro⁶.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

La investigación se realizó mediante la aplicación de un estudio de tipo bibliográfico.

- Bibliográfico: Se utilizaron fuentes bibliográficas primarias, las cuales proporcionaron la información adecuada para poder hacer una selección y compilación de métodos que pudieran emplearse para la aplicación de la prueba Antígeno Prostático Específico, en prendas de vestir, de tal manera que pudiera ser utilizada como bibliografía de consulta por los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Documental: Se basó en la búsqueda, obtención y análisis de información proveniente de documentos relacionados con la temática “semen como evidencia forense, en delitos de agresión sexual” y fundamentos sobre la efectividad del método (PSA) para detectar presencia de semen en prendas de vestir identificando los factores externos que pueden limitar su aplicación.

4.2 Investigación bibliográfica

Esta se llevó a cabo utilizando material bibliográfico obtenido de:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador, campus central (UES)
- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca digital de la Universidad de El Salvador y bases de datos pertenecientes al sistema bibliotecario universitario.
- Artículos y revistas científicas.
- Bases de datos encontradas en internet. (EBSCO, Sci Hub, Google académico, NIST, etc.)

4.3 Desarrollo

Debido a que la investigación se desarrolló completamente de carácter bibliográfico, esta se ejecutó en etapas, con la finalidad de poder seleccionar el material bibliográfico que fuera de mayor utilidad para los fines de esta investigación.

Estas etapas se dividieron de la siguiente manera:

4.3.1. Búsqueda del material bibliográfico para su selección.

- La búsqueda del material bibliográfico se hizo a través de:
- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador – Dr. Benjamín Orozco
- Biblioteca virtual de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas
- P. Florentino Idoate
- Bases de datos proporcionadas por el sistema bibliotecario digital de la Universidad de El Salvador (EBSCO, Tirant online)
- Bases de datos proporcionadas por el sistema bibliotecario digital de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas (MEDLINE PubMed, ASTM)
- Bases de datos disponibles en internet: Google académico, Sci-Hub, NIST, Scielo

Para la selección del material bibliográfico fueron de principal interés aquellos títulos que involucraron: Utilización de la prueba Antígeno Prostático Específico total (PSA), para la detección de semen en prendas de vestir como evidencia en delitos de agresión sexual dentro de su contenido; para el caso de los recursos digitales se hizo uso de palabras clave que facilitaran la delimitación de información, algunos ejemplos de palabras claves fueron: PSA, detección de semen, agresión sexual, serología forense y prendas de vestir; cabe destacar que las palabras claves pudieron ser en inglés o en español para ampliar la obtención de material.

4.3.2. Análisis y selección del material consultado.

Una vez recopilados los libros, artículos, trabajos de grado, revistas científicas y monografías utilizados, estos fueron agrupados mediante el uso del software de manejo de referencias “Mendeley”, cuya función fue organizar por medio de filtros los documentos seleccionados. Mencionar que, esta herramienta fue utilizada únicamente con aquellos recursos que fueron obtenidos de manera digital.

La aplicación de esta herramienta fue vital, ya que, permitió descartar todos aquellos textos o títulos que pudieran contener información sobre el tema, pero que no tenían importancia o relevancia para la investigación.

En el caso del recurso bibliográfico que se consultó en físico se empleó una lectura rápida del título, introducción, índice y conclusiones, esto con el fin de identificar cuáles recursos podían aportar información relevante para la compilación. Al finalizar la delimitación de dichos documentos, se procedió con la lectura de cada uno de ellos.

4.3.3. Diseño de una Práctica de laboratorio

Una vez finalizada la lectura de cada uno de los recursos bibliográficos seleccionados, se reunió la información más relevante para la fundamentación del tema y del método de análisis, con la finalidad de, diseñar una práctica de laboratorio en base a los lineamientos establecidos (Ver Anexo. N° 1).

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE SEMEN EN PRENDAS DE VESTIR, UTILIZANDO EL MÉTODO DE DETECCION ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECIFICO P30.



Objetivos:

- Aplicar los conocimientos técnicos sobre extracción y manipulación del indicio biológico semen.
- Determinar cualitativamente la presencia de proteína P30 en líquido seminal humano en muestras de tela impregnadas con semen.
- Determinar la efectividad de la prueba, detectando de forma cualitativa la presencia de proteína P30 en líquido seminal humano en muestras de tela impregnadas con semen después de 72 horas.

Fundamento Teórico:

La Proteína “P30” es una glicoproteína producida por células de la glándula prostática en el varón, es una serínproteasa (enzima proteolítica) que activa una proteína en la vesícula seminal. El antígeno prostático específico (PSA) es secretado al fluido seminal donde tiene una función en el clivado de proteínas de la vesícula seminal y en la licuefacción del coágulo seminal.

Esta proteína es un marcador aceptado para la detección de líquido seminal en casos donde se sospecha abuso sexual, ya que, es detectable incluso en individuos vasectomizados o azoospermicos.

La determinación de esta proteína se hace por medio de la inmunocromatografía, y su fundamento se sustenta en la formación de un complejo anticuerpo – antígeno, es decir, en una reacción donde un anticuerpo se enlaza a un antígeno con el fin de facilitar que otras células del sistema inmunitario lo identifiquen y que a consecuencia de ello lo inhiban (Ver Figura. N°1).

Ese complejo migra a través de la membrana del dispositivo hasta el área de prueba y el área control, áreas en las que interactúa con un anticuerpo policlonal de manera que se forma un complejo anticuerpo – antígeno – anticuerpo que será verificable a simple vista por la aparición de una línea de color rosado tanto

en el área “T” como en el área “C”, con lo cual se entiende como un resultado positivo para la presencia de la proteína P30.

Si a consecuencia de la pericia únicamente se colorea la línea del área “C”, el resultado es negativo, lo cual daría fe no solo de la ausencia de la proteína P30 sino también del buen funcionamiento de la prueba y si no aparece ninguna línea de color en el área de control “C”, la pericia debe tenerse por inválida con independencia de la presencia o ausencia de línea de color en el área de prueba “T” (Ver Figura. N° 2).

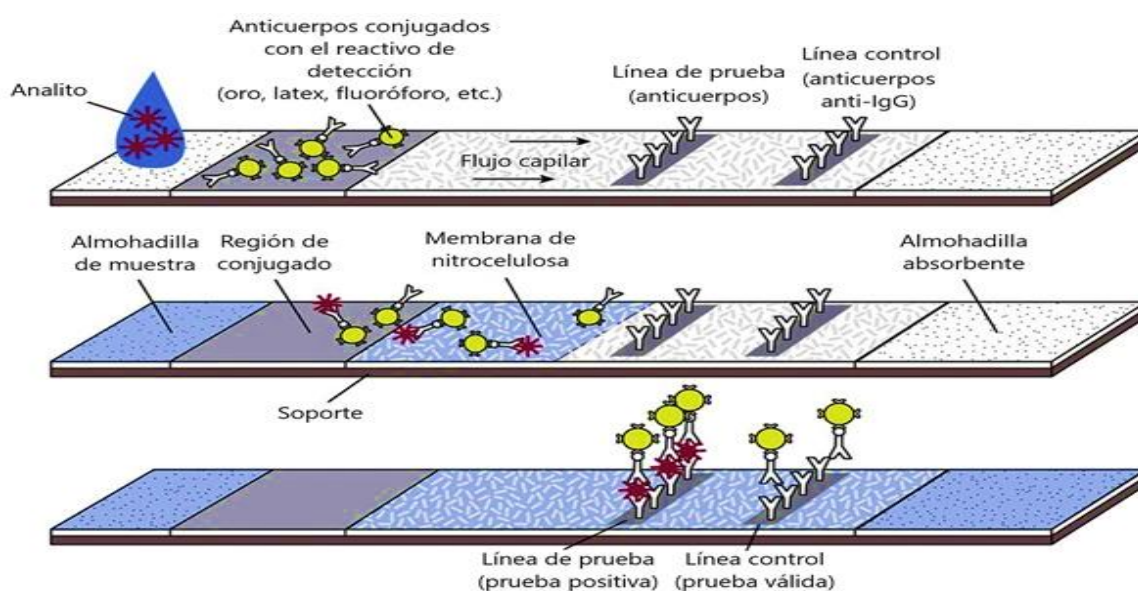


Figura. N°1. Reacción antígeno prostático específico.

La especificidad de la técnica:

- La hemoglobina (10g/L) bilirrubina (100mg/L) y muestras lipémicas (5g/L) no interfieren con los resultados de la prueba.
- 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.

- Se pueden obtener resultados positivos en hombres vasectomizados y en muestras de orina post eyaculación en adultos.

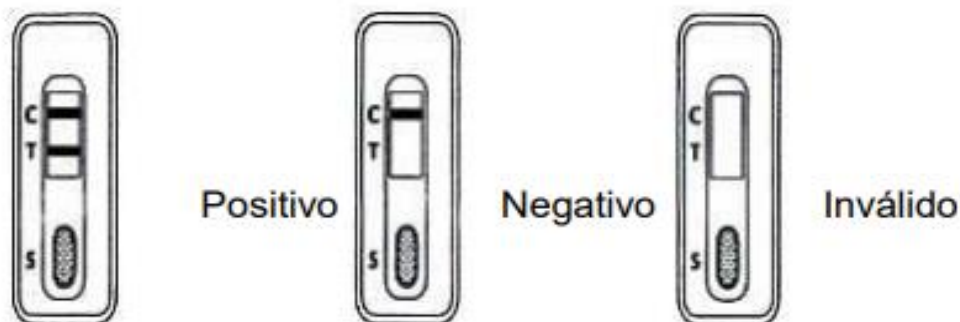


Figura. N° 2. Dispositivo de pruebas en base a resultados.

Equipo:

- Cámara fotográfica
- Vórtex
- Refrigerador
- Lámpara UV
- Centrífuga
- Casetes para Identificación Forense de P30, Abacus ABACard P30. (Ver Anexo. N° 1).

Materiales:

- Guantes de nitrilo
- Gabachón
- Tijeras estériles
- Pinzas
- Bisturíes
- Hisopos
- Microtubos
- Micropipeta (500 – 1000) μ L

- Puntas para micropipeta (500 – 1000) μ L
- Cronómetro
- Rotulador (marcador)
- Recipiente para desechos biológicos.
- Hisopos estériles
- Gorro o cofia
- Gafas protectoras
- Mascarilla
- Testigo métrico
- Cinta adhesiva

Reactivos:

- Solución Buffer para la extracción de p30.

Conocimientos previos:

Conocimiento técnico de laboratorio analítico y buenas prácticas de laboratorio, manipulación de instrumentos pequeños y de riesgo biológico.

Existen muchos casos en los que los fluidos biológicos como el semen se deben retirar de soportes sólidos (prendas de vestir, sábanas, toallas, papel entre otros) para posterior estudio de la proteína P30. Para estos casos debemos recurrir a un procedimiento llamado levantamiento de evidencias mediante el sistema de visión espectral en donde recuperamos los fluidos biológicos para su estudio.

Actividad previa a la práctica de laboratorio:

Ver detenidamente el video del enlace indicado, recordar activar los subtítulos en inglés (no los generados automáticamente, si no los creados por los autores):

<https://www.youtube.com/watch?v=E3COc2Thh4k>

<http://www.abacusdiagnostics.com/abacard30presidentsdnainitiative.wmv>

Procedimiento:

1. Revisar cadena de custodia y verificar las evidencias que serán sometidas a análisis.
2. Verificar el área de trabajo y que los materiales a utilizar sean previamente esterilizados para su uso.
 - Esterilizar el área de procesamiento de evidencias (mesa de trabajo) con amonio cuaternario y/o alcohol al 70%.
 - Preparar materiales a utilizar.
3. Realizar un examen visual exhaustivo y minucioso de las prendas y evidencias. Identificar las características de las muestras y anotar en libreta.
4. Observar el soporte sólido en la luz forense.
5. Identificar la zona en donde existe fluorescencia para determinar la ubicación del supuesto fluido biológico.
6. La extracción de muestras en superficies sólidas se tomará con (corte longitudinal un corte aprox. 3mm o 5mm).
7. En un microtubo colocar 750ul de buffer de extracción.
8. Agitar en un dispositivo Vórtex por 5 segundos.
9. Colocar en refrigeración por dos horas (2-8 grados centígrados), (Este procedimiento recupera aproximadamente el 99% de p30 extraída de la muestra)
10. Dejar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
11. Centrifugue la muestra 3 minutos a 3.600 rpm después del paso de extracción.
12. Remover el dispositivo y el gotero del paquete sellado del Kit de prueba.
13. Etiquetar el dispositivo con el número de caso.
14. Adicionar 300ul (6-7gotas con el gotero) de la muestra en la placa cromatográfica del test Abacus ABACard P30.
15. Leer los resultados a los 10 minutos.

16. Esta alícuota podría ser almacenada entre 2-8 grados centígrados sino se usa inmediatamente.

NOTA:

- Tener presente que, los resultados positivos pueden observarse después de un minuto, esto dependiendo de la concentración de p30.
- Tener en cuenta que, para resultados negativos se deben esperar mínimo, 10 minutos.
- Valorar que, la muestra restante también puede ser utilizada para el análisis de ADN, sin afectar el rendimiento de ADN.
- Ver Anexo N° 2.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. En el país no existen investigaciones que profundicen sobre la prueba del antígeno prostático específico en cuanto a su aplicación para la detección del indicio biológico semen en casos de agresión sexual, esto debido a que, la prueba de tipo test que se emplea tiene su origen en el análisis clínico como biomarcador del cáncer de próstata y por lo cual en el análisis de serología forense se ha dejado como una prueba confirmatoria.
2. La investigación realizada sobre la utilización de la prueba antígeno prostático específico en la detección de semen, en casos de agresión sexual es de tipo bibliográfico y documental, por consiguiente, se diseñó una práctica de laboratorio para implementar dicha técnica, la cual, pueda llevarse a cabo por los estudiantes que cursen la asignatura de Química forense y Toxicología en la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
3. La prueba de Antígeno Prostático Específico, presenta ventajas en comparación con las demás técnicas que se emplean para identificar el semen, dado que, esta prueba es de bajo costo y se fundamenta en la inmunocromatografía que se integra en un dispositivo tipo test el cual arroja resultados en pocos minutos después de colocar la muestra en el dispositivo.
4. Los artículos científicos que han ensayado el uso de la prueba de Antígeno Prostático Específico, en el análisis de semen han demostrado que los factores interferentes en su efectividad son pocos y se relacionan con la toma de muestra del indicio y no del análisis.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Difundir la presente investigación a los estudiantes de la carrera Licenciatura en Química y Farmacia, para fortalecer el conocimiento técnico y científico en la aplicación de técnicas de análisis forense.
2. Que las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador gestionen, la compra de recursos necesarios para la implementación de la práctica de laboratorio propuesta, “Determinación de semen en prendas de vestir, utilizando el método de detección antígeno prostático específico p30”, en el temario de la materia Química Forense y Toxicología impartida en la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia.
3. Que los docentes encargados de los laboratorios prácticos en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, implementen la prueba de Antígeno Prostático Específico diseñada en esta investigación en diferentes soportes o muestras que contenga posibles indicios de semen.
4. Que en futuros trabajos de graduación pueda ser considerada esta investigación para futuras investigaciones relacionadas en la búsqueda de nuevas técnicas de análisis forense en indicios biológicos, y contribuir de esta manera en la investigación nacional, ya que, en la actualidad, no se encuentran estudios relacionados con este tema.

BIBLIOGRAFIA

1. Universidad Nacional de Loja. [Internet]. Ecuador. 2018-2019. [Consultado el 12 de mayo de 2022]. Disponible en:
<https://www.studocu.com/ec/document/universidad-nacional-de-loja/anatomia/biologia-forense-unidad-iii/1458748>
2. López García J, Urbano Felices A, Cárdenas Povedano M. Manual analítico y técnico de ayuda al diagnóstico de la esterilidad y subfertilidad de origen masculino y preparación de semen para las técnicas de reproducción asistida. 1ª ed. OmniaScience;2012.
3. Allery, J., Telmon, N., Mieusset, R., Blanc, A., Rougé, D. Cytological Detection of Spermatozoa: Comparison of Three Staining Methods. J Forensic Sci; 2001. p. 349-351.
4. Uribe Arcila, J.F. La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. Medicina & Laboratorio; Editora Médica Colombiana S.A; 2008.
5. Observatorio de igualdad de género de América Latina y el Caribe [Internet] Washington DC: Naciones Unidas; 2014 [Consultado el 7 de mayo del 2022]. Disponible en:
https://oig.cepal.org/sites/default/files/20184_violenciasexual.pdf
6. Rozo, M. La Mujer como sujeto especial de protección en las políticas públicas de desplazamiento forzado: una muestra de la realidad. [Tesis de Licenciatura en Ciencias Jurídicas]. Bogotá, Colombia: Universidad Católica de Colombia; 2014.

7. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre. Barcelona: Reverté, S.A; 1983. Capítulo 19, Órganos de reproducción y embarazo; 705. Disponible en:
<https://books.google.com.sv/books?id=5HNSGRm0aWMC&pg=PA705&dq=morfologia+del+espermatozoide&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjF2qv79eD8AhUImYQIHaHABi4Q6AF6BAglEAI#v=onepage&q=morfologia%20del%20espermatozoide&f=false>
8. L.J. Laverde-Angarita, Y. Clavijo bolívar. Influencia de los soportes, tiempo, origen e interferencias de observación de fluidos biológicos con luces forenses, 2018. Colombia. [Consultado el 11 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/ml/article/download/1215/1414>
9. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Inmunología Celular y Molecular. Octava edición. Elsevier Saunders; 2015. [Consultado el 15 de mayo 2022]. Disponible en: <https://www.mabxience.com/wp-content/uploads/2018/11/esquema-produccion-anticuerpos-monoclonales-mabxience.png>
10. Tineo Tineo, D., Jaime Vargas, C., y Rosas Quintana, I. Investigación de fluidos seminales con pruebas rápidas de antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida prostática (FAP) y microscopía, en muestras relacionadas con delitos sexuales. Rev Ministerio Público de la Nación – República del Perú, Instituto de Medicina Legal del Perú [Internet] 2018. [Consultado el 9 de mayo de 2022]; (1). 1-8. Disponible en: https://www.mpfm.gob.pe/escuela/contenido/actividades/docs/6559_investigacion_de_fluidos_seminales_con_psa_y_fap_en_delitos_sexuales.pdf

11. Cifuentes, S. Validación del método de detección del antígeno prostático específico (PSA), por inmunocromatografía (Orgenics) aplicado a líquido seminal presente en manchas secas y escobillones. Rev Colombia Forense [Internet]. 2016. [Consultado el 9 de mayo de 2022]; 1(3): 24-28. Disponible en: <https://doi.org/10.16925/cf.v1i3.1385>
12. Quispe, S. (2015). Investigación forense del Antígeno Específico de Próstata (PSA) en delitos de agresión sexual, en diversos fluidos biológicos humanos de interés forense. Rev CON-CIENCIA [Internet]. 2015. [Consultado el 11 de mayo de 2022]; 1(1), 61-68. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652015000100007&lng=es
13. Ayala Pacheco, Sara; Parada, Leonora Elisa y Pérez Ventura, José Matias. Aportes de la prueba científica serología forense y ADN en el delito de violación sexual en el municipio de San Salvador año 2004-2006. [Tesis de Licenciatura en Ciencias Jurídicas]. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador; 2007.
14. Forensic Lab Version: Watch a video on the ABACard P30 under Presidents DNA Initiative. Disponible en: <http://www.abacusdiagnostics.com/semem.htm>
15. Fiscalía General del Estado. (25 de agosto de 2014). Resolución No. 073-FGE-2014 - Manuales, Protocolos, Instructivos y Formatos del Sistema Especializado Integral de Investigación Medicina Legal y Ciencias Forenses. Quito: Registro Oficial No. 318

16. Bolaños H. Regulación jurídico-penal de los delitos sexuales en El Salvador. Análisis desde una perspectiva de género. Rev Realidad y Reflexión. [Internet]. 2015 [Consultado el 26 de junio del 2022]; N (41). Disponible en: <https://icti.ufg.edu.sv/doc/RyRN41-B.Vasquez.pdf>

17. Sociedad Americana Contra el Cáncer [Internet]. España; 2022 [Consultado el 26 de junio del 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-diagnostica.html#referencias>

GLOSARIO

Antígeno prostático específico (PSA): es una sustancia proteica sintetizada por células de la próstata. Su función es disolver el coágulo seminal.

Agresor: individuo que ataca o agrede a otro, sea adulto, adolescente, niño o niña, con el fin de dominarlo sexualmente, tanto sea en forma de abuso sexual como de violación.

Azoospermia: total de espermatozoides en el eyaculado seminal.

Cáncer de próstata: es una enfermedad por la que se forman células malignas (cancerosas) en los tejidos de la próstata.

Delito sexual: ocurre cuando una persona es obligada a realizar actividades sexuales sin su consentimiento.

Dilución: consiste en bajar la cantidad de soluto por unidad de volumen de disolución. Se logra adicionando más diluyente a la misma cantidad de soluto.

Estupro: es un delito sexual que se produce cuando una persona, generalmente mayor de edad, mantiene relaciones sexuales con una persona adolescente, que consiente la relación, mediante el engaño o el abuso de superioridad sobre aquella persona.

Enzima: es un catalizador biológico. Es una proteína que acelera la velocidad de una reacción química específica en la célula.

Fosfatasa ácida prostática (FAP): es una enzima producida por la próstata. Se puede encontrar en cantidades mayores en hombres que tienen cáncer de próstata u otras enfermedades.

Fluidos seminales: es un líquido expulsado por los varones durante la eyaculación. Este líquido contiene dos partes bien diferenciadas:

espermatozoides (aproximadamente un 10%) y plasma seminal, un conjunto de sustancias que acompañan a los espermatozoides para que estos puedan llevar a cabo su función.

Fluorescencia: es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente.

Hematoxilina: son tinciones que se usan comúnmente en muestras de tejido para que puedan verse bajo el microscopio.

Inmunocromatográfica: es una técnica inmunológica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal del conjugado en zonas específicas del papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura.

Inmunoensayo ELISA: es un método utilizado para detectar cuantitativamente un antígeno en una muestra.

Marcadores genéticos: es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear.

Patrón: Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud.

Pruebas rápidas: identifican la presencia de anticuerpos o antígenos y muestran el resultado de manera cualitativa, positivo o negativo.

PH: es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa.

Serología forense: es la detección, identificación, clasificación y estudio de diversos fluidos corporales, como sangre, semen, saliva y orina, y su relación con la escena del crimen.

STR autosómicos: (por sus siglas en Ingles “Short Tandem Repeats”) que son elementos formados por secuencias sencillas de ADN.

Vasectomía: método permanente de anticoncepción para los hombres. Es una operación sencilla que hace que el semen quede libre de espermatozoides al Ocluir los conductos que normalmente los conducen para mezclarlos con el líquido seminal.

Validar: es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba en concreto es adecuado para su uso previsto.


ANEXOS

ANEXO N°1.

Tabla N°1. Lineamientos a seguir para estructura de la práctica de Laboratorio

<p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</p> <p>FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA</p> <p>CURSO DE ESPECIALIZACIÓN</p> <p>“ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL”</p> <p>ESTRUCTURA DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO</p> <p>El presente documento establece el contenido a ser considerado para la estructuración de la propuesta de práctica de laboratorio, que presentarán los egresados al concluir el Curso de Especialización y contendrá los siguientes apartados:</p>	
<p><i>Portada:</i></p> <p>Nombre de la Facultad (Centrado)</p> <p>Nombre de la Práctica (Centrado)</p> <p>Imagen alusiva a la temática (Centrado)</p> <p><i>Objetivos:</i></p> <p>Establecer un mínimo de tres Objetivos, no es necesario diferenciar entre objetivo general y específicos.</p> <p><i>Fundamento Teórico:</i></p> <p>Deberá incluirse el fundamento químico, puede incluirse reacciones químicas que ayuden a la comprensión del tema</p> <p><i>Equipo, Materiales y Reactivos:</i></p> <p>Debe desglosarse cada uno de estos requerimientos para el desarrollo de la práctica.</p> <p>En cuanto del equipo deben ser incluidas las especificaciones.</p> <p>Los materiales deben ser detallados, de igual manera se deberán incluir las especificaciones.</p> <p>Los reactivos, deben detallarse los que se utilizarán en estado puro y los preparados, incluyendo información como concentraciones en caso de ser necesario.</p>	<p><i>Conocimientos Previos:</i></p> <p>Plasmar cualquier conocimiento previo que sea necesario para que el estudiante comprenda de manera íntegra la práctica que va a desarrollar y que no se contempla en el fundamento teórico.</p> <p><i>Procedimiento:</i> Deberá ser presentado paso a paso de manera secuencial, podrá incluir un esquema que permita visualizar mejor el proceso.</p> <p><i>Procedimiento:</i></p> <p>Deberá ser presentado paso a paso de manera secuencial, podrá incluir un esquema que permita visualizar mejor el proceso.</p> <p><i>Referencias Bibliográficas:</i></p> <p>De acuerdo a Normas VANCOUVER Anexos: Principalmente los que complementen al apartado de Equipo, Materiales y Reactivos; para este último se deberá incluir la forma de preparación de aquellos que no se utilicen en forma pura. La práctica diseñada, constituirá un capítulo del informe final, como producto de haber concluido el Curso de Especialización, como modalidad de trabajo de grado.</p>

ANEXO N°2
Especificaciones ABACard Test

 Abacus diagnostics, Inc.
ABAcard® p30 Test For The Forensic

Identification of Semenc

For Forensic Use

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

Catalog # 308332 (25 Test/kit)

Technical Inforation sheet

Intended Use

ABAcard p30 test is designed to qualitatively detect p30 for the forensic identificatin of semen. P30 is an accepted marker for detecting semen inncriminal cases including vasectomized or azoospermic individuals.

Summary

In 1971 Hara et al. first described a protein in the seminal fluid, named gammaseminoprotein. 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 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, 20 µl of sample is added to the sample well 's', and allowed to soak in. If p30 present in the semen specimen, it Will react with the mobile monoclonal antihuman p30 antibody and a mobile antigen antibody complex in 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

ANEXO N°2.

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. Test Instructions

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.

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 HEPES buffered saline for 2 hours at 2-8 °C. Distilled water or other buffers suitable for further DNA extraction may be used as well. 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 análisis 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 8 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.

Figura N°4. Especificaciones ABACard P30 Test.



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 sealed pouch.
- Disposable gloves should be worn while handling kit reagents or specimens.
Wash your hands after the test.
- A fresh transfer pipette for each specimen should be used.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are being handled.
- Handle all forensic samples as if they were capable of transmitting disease.
Follow standard procedures for proper disposal of specimens.
- Kit reagents contain sodium azide as a preservative which may react with lead or copper in plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal, always flush with large volumes of water to prevent build up in drains.

Quality Control

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

Limitations

1. ABACard p30 Test is only for in vitro detection of p30 for the forensic identification of semen.

2. The test must be performed in strict accordance with these instructions to obtain accurate and reproducible results.
3. Even if the test result is positive, careful forensic judgment should be made in conjunction with other information and information from other test results.
4. If elevated p30 levels is suspected but a negative result is obtained, the test should be repeated and with fresh specimen.
5. Positive results may be obtained with male urine, which has a reported 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.
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, p30 Test is 4ng/ml in 10 minutes (using Stanford's seminal plasma derived Standard, Catalog # L-FS00, Phone # (650)725-5542 with PBS/BSA Buffer, pH 7.4, Sigma Catalog # P3688). 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 p30 Test over a three-month period. The assay results were 100% in agreement with the expected results.

Figura N°4. Continuación.

Manufactured by: Abacus Diagnostics, Inc.

6320 Platt Ave Unit 4220
West Hills, CA 91307 USA
Phone (877) 225-9900
Fax (818) 17 16-947|

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, 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 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) 725-5542.

You may order PBS/BSA buffer from Sigma (Cat# P3688) by calling (800)-325-3010

Figura N°4. Continuación.

References

- (1) Benton, K. A., Donahue, L.A. Valadez, Jr., M. Analysis of the ABACard, p30 Test for use in the forensic laboratory. 1998.
- (2) Kuester, J., Rothenberg, D, Schwartz, E, Eustace, M., Adamo, R. Validation of a commercial p30 kit (ABACard.) for forensic identification of semen. 1998.
- (3) Carradine, C.C. Evaluation of ABACard, p30 test for the forensic identification of Semen, 1998.
- (4) Kristaly, A., Smith, D.A.S. Validation of ABACard, p30 test for the rapid forensic identification of Semen, 1999.
- (5) 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.
- (6) Cartledge JJ et al. The stability of free and bound prostate-specific antigen. *BJU Int*, Nov; 84(T):p 810-4, 1999
- (7) Sokoll, L.J., Chan, D.W. p30. Its discovery and biochemical characteristics. *Urologia Clinics of North America*. v24(2), p253-9, 1997.
- (8) Diamandis, EP. Yu, He. Nonprostatic Sources of Prostate-Specific Antigen. *Urologic Clinics of North America*. v24(2), p275-82, 1997.
- (9) 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*. V27(4), p198-203, 1995.
- (10) Jimenez, Verdejo.A., Osuna, E, et al. Study of the enzymatic activity of GGT, LDH, PAP and p30 in semen stains; application to age calculation. *For. Sci. Int* v68(1), p 7-15, 1994.
- (11) Armbruster, D.A. p30; biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clinical Chemistry*. V 39(2), p 181-95, 1993.
- (12) Stowell, L.I. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for p30. *For. Sci. Int*. v50(1). p 125-38, 1991.
- (13) Engelmann, U.H, Schramek, P., Tomamichel, G., Deindl, F., Senge, TH. Vasectomy reversal in central Europe; results of a questionnaire of urologists in Austria, Germany and Switzerland. *J. Urol*. v143(1), p 64-67, 1990.
- (14) 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.
- (15) Willot, G.M. Frequency of azoospermia. *For:Sci. Int*. v 20(1), p 9-10, 1982.
- (16) 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*. v23 (1) p 106-115, 1978.

ANEXO No.3.

Plan de trabajo de la práctica de laboratorio.

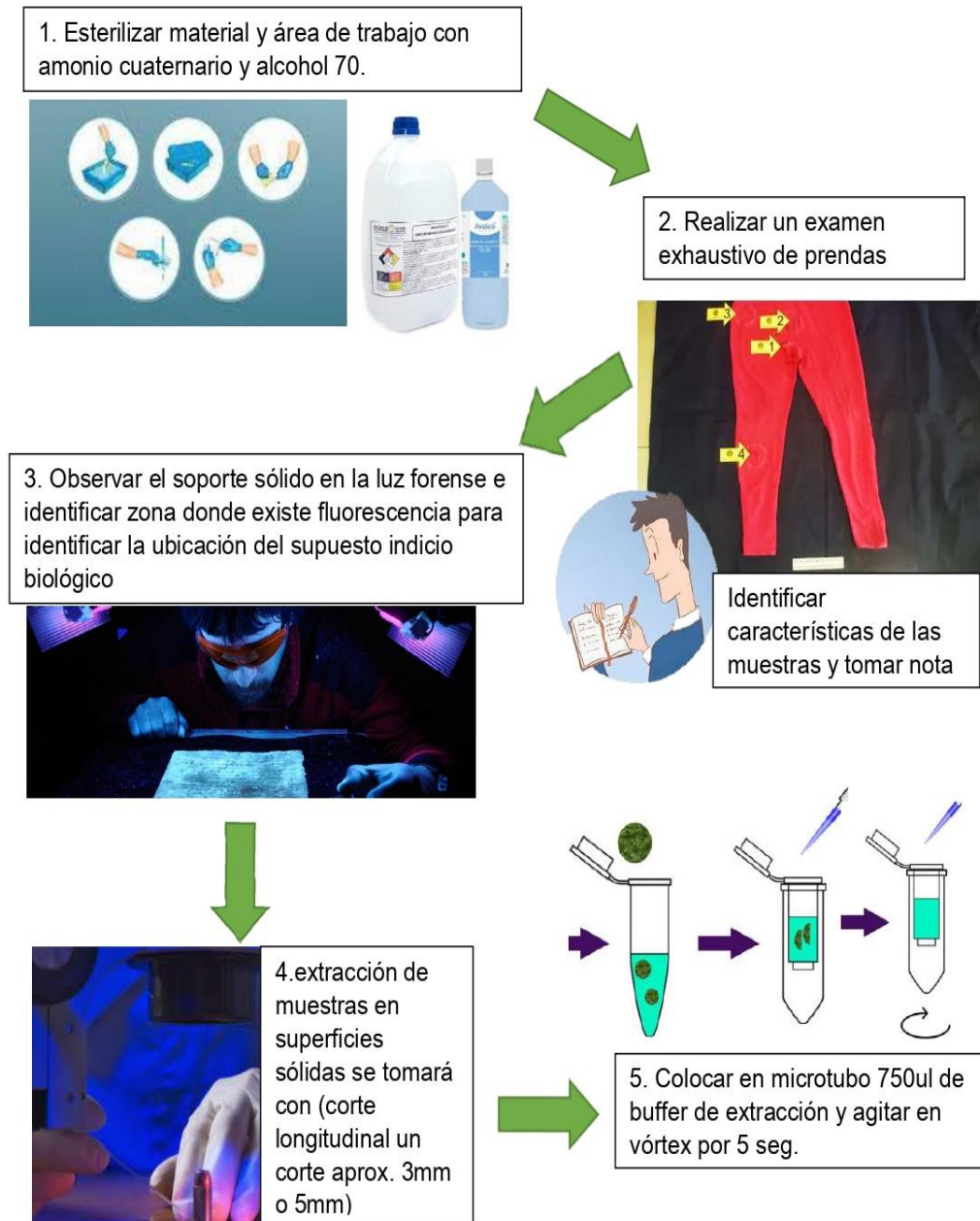


Figura N°5. Plan de trabajo del procedimiento experimental de la práctica de laboratorio.

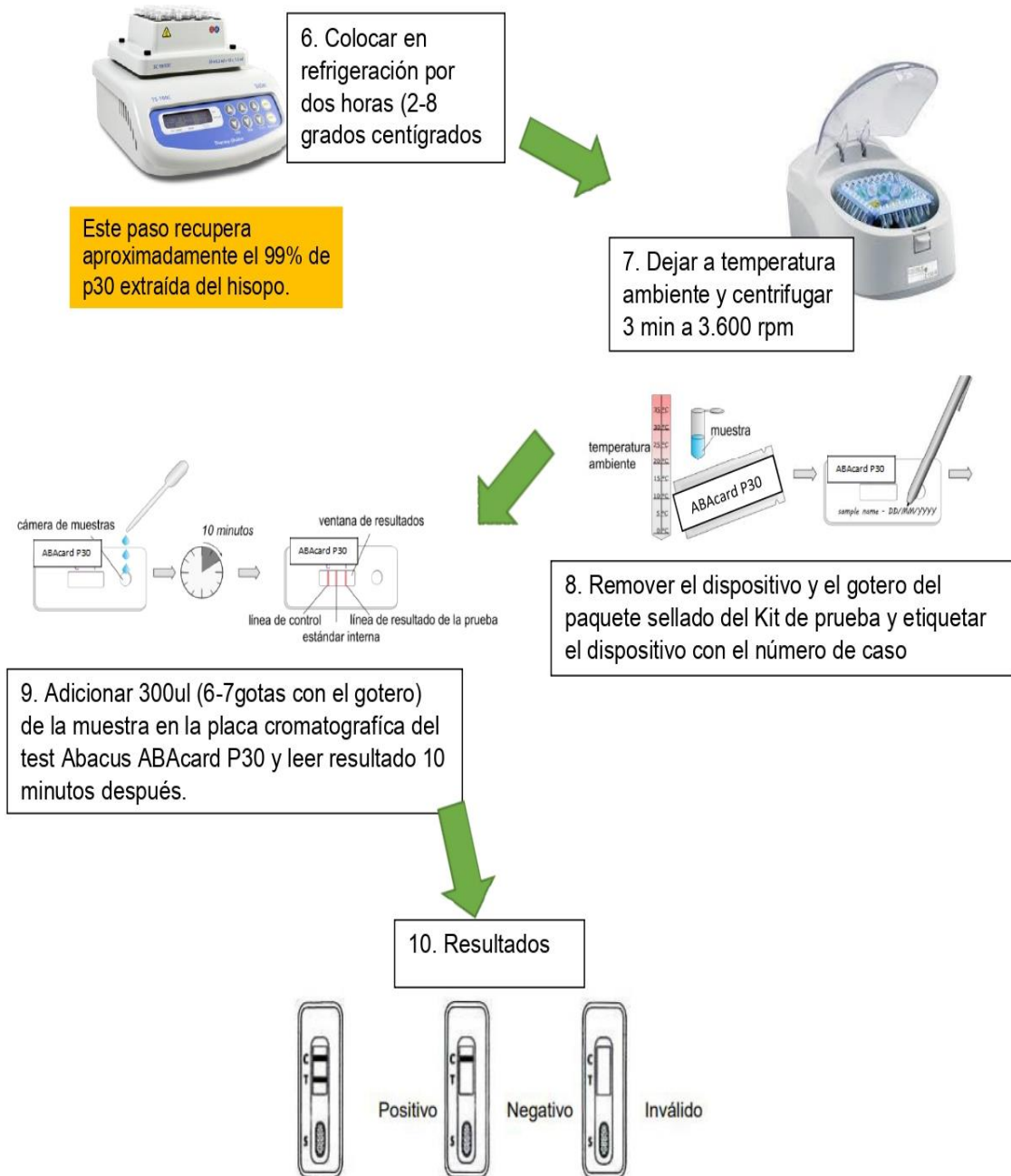


Figura N°5. Continuación.