



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ)  
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN  
POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA  
P30**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-BQM-11**

Versión: 15

Rige desde: 24/04/2024

PAGINA: 1 de 9

**Elaborado o modificado por:**

**M.Sc. Melissa Rojas Araya  
Profesional en Genética Forense  
Sección de Bioquímica**

**Dr. Glen Arrieta Castro  
Profesional en Genética Forense  
Sección de Bioquímica**

**Raquel Ortiz Arguedas  
Técnico Especializado  
6 Sección Bioquímica**

**Visto Bueno Encargado de Calidad:**


**Dr. Alejandro Hernández Bolaños  
Profesional en Genética Forense  
Encargado de Calidad de la Sección de  
Bioquímica**

**Revisado por Líder Técnico:**

**Anayanci Rodríguez Quesada  
Profesional en Genética Forense  
Líder Técnico de Sección/Unidad de  
Bioquímica**

**Aprobado por:**

**Dra. Eugenia Fernández Mora  
Jefatura Sección de Bioquímica**

 <p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p><b>PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30</b></p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p><b>P-DCF-ECT-BQM-11</b></p>
	<p>Versión: 15</p> <p>Rige desde: 24/04/2024</p>

### CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	01/11/2011	16/07/2012	Versión Inicial del Procedimiento	-	MEE
02	16/07/2012	30/10/2015	Revisión del PON	-	MEE
03	30/10/2015	24/03/2017	Revisión del PON	26-2015	EFM
04	24/03/2017	05/06/2017	Revisión del PON y cambio de formato	30-2017	EFM
05	05/06/2017	10/08/2017	Revisión del PON	50-2017	EFM
06	10/08/2017	06/06/2018	Revisión y edición del PON	66-2017	EFM
07	06/06/2018	07/12/2018	Revisión y edición	08-2018	EFM
08	07/12/2018	13/05/2019	Revisión y edición	23-2018	EFM
09	13/05/2019	01/08/2019	Revisión y edición	06-2019	EFM
10	01/08/2019	11/02/2021	Corrección de preparación y codificación de controles positivos	16-2019	EFM
11	11/02/2021	22/06/2021	Cambio en la redacción nota de reporte de prueba positiva	07-2021	EFM
12	22/06/2021	29/07/2021	Modificaciones posteriores a Auditoria Interna	20-2021	EFM
13	29/07/2021	16/11/2023	Correcciones	38-2021	EFM
14	16/11/2023	24/04/2024	Revisión y corrección	25-2023	EFM
15	24/04/2024		Revisión y edición	10-2024	EFM

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL  
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

**La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 3 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

### 1 Objetivo:

El objetivo de este PON es realizar la determinación de fluidos seminales (Proteína P30) indicativos de la presencia de semen en casos forenses en diferentes tipos de extractos.

### 2 Alcance:

Este PON se emplea para verificar o descartar la presencia de fluido seminal en extractos cuando no se ha observado la presencia de cabezas típicas de espermatozoides en la tinción de Christmas tree.

### 3 Referencias:

- Coastal Healthcare. 1992. Bloodborne Pathogens. Virginia Beach, VA.USA.
- Gartside, Bill et al. 2003. Estimation of Prostatic Specific Antigen extraction efficiency from Forensic Samples using the Seratec PSA semiquant semiquantitative Membrane Test. Forensic Science Communications. Vol 5, N° 2.
- Hochmeister, Manfred et al. 1999. Evaluation of Prostatic Specific Antigen (PSA) Membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. Journal of Forensic Science. 44:1057-1060.
- Panfleto incluido en el Kit para determinación de p30: "OneStep ABACard® p30 Test For The Forensic Identification of Semen".
- Roitt, Ivan et al. 2000. Inmunología. Harcourt, España. Quinta edición.
- Stenman, Ulf-Hakan et al. 1999. Prostatic Specific Antigen. Cancer Biology. 9:83-93.
- Villoutreix, Bruno et al. 1996. Structural investigation of the  $\alpha$  1- antichemiotrypsine: Prostatic Specific Antigen complex by comparative model building. Protein Science. 5:836-857.

### 4 Equipos y Materiales:

- Gabacha blanca desechable.
- Guantes desechables.
- Marcador con tinta indeleble.
- Micropipeteadores ajustables de 0,5-10 $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 10-200uL, 100-1000uL.\*
- Papel toalla desechable.
- Pizetas de 500 mL.
- Puntas para micropipeteadores de 10uL, 200uL, 1000uL nuevas y estériles.\* \*
- Recipiente con bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, de color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso.
- Refrigerador con temperaturas cercanas a los 4 °C. (rango 2-8°C)
- Reloj de intervalos. (rango de 1 a 60 minutos  $\pm$  1 segundo o similar)
- Formulario: Lista de Verificación para la Investigación por Semen.
- Formulario: Reporte de Bitácora Semen, Sección de Bioquímica.

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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 4 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

\*\* Para la esterilización de estos materiales, ver: Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado.

## 5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua tipo Milli-Q o similar estéril (Ver: Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado).
- Control positivo: Aplicadores impregnados con semen (ver Anexo 2)
- Control de reactivos Negativo (ver Anexo 2)
- Descontaminante de ADN y DNAsas DNAway Cat. 7010 o similar.
- Etanol al 70%, grado comercial
- Kit comercial para la determinación cualitativa de p30 "ABACard® p30 Test For The Forensic Identification of Semen" o similar.
  - Placa Inmunocromatográfica
  - Pipeta plástica
  - Buffer (tampo) de extracción.

## 6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento para realizar la determinación de fluidos seminales debe efectuarse en las áreas designadas para el análisis de indicios para investigación por semen (pre amplificación) de la Sección de Bioquímica.

## 7 Procedimiento:

**Nota 1:** Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento para la Investigación por Semen: Sección de Bioquímica como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

- 7.1** Utilice guantes, gabacha y mascarilla desechable.
- 7.2** Limpie cuidadosamente la mesa de trabajo con DNA Away Cat 7010 o similar y/o etanol al 70% utilizando toallas de papel desechables.
- 7.3** Busque los extractos a analizar, incluyendo el control positivo y el control negativo.
- 7.3.1** Rotule, utilizando una de las siguientes abreviaturas, el control positivo (CP-CPOS-Control Positivo-POS) y el control negativo (CN-CNEG-Control Negativo-NEG).
- 7.4** Seleccione los extractos a analizar con al menos alguno de los siguientes resultados:
  - 7.4.1** No se observa presencia de cabezas típicas de espermatozoides en la tinción de Christmas Tree.
  - 7.4.2** Resultado No Noncluyente.
- 7.5** Centrifugue por 6-7 minutos entre 12000 y 14000 rpm los tubos de microcentrífuga.
- 7.6** Deje las muestras a temperatura ambiente por al menos 10 minutos.
- 7.7 Determinación de Proteína p30:**
  - 7.7.1** Verifique la fecha de vencimiento y el número de lote del kit para p30, anotando ambos datos en el Formulario "Reporte de Bitácora Semen, Sección de Bioquímica".
  - 7.7.2** Rotule cada placa con al menos el número de OT respectivo y el nombre del objeto (muestra) a analizar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 5 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

**7.7.3** Incluya un control positivo y un control negativo por cada lote de muestras que va a analizar, para verificar el funcionamiento apropiado del lote del kit de p30 que se está utilizando. Ver rotulación en punto 7.3.1

**7.7.4** Agregue 6 gotas o 200 uL del sobrenadante del extracto, del control positivo o del control negativo, al pozo que se encuentra al lado de la letra "S" en la placa para p30 previamente rotulada.

**7.7.5** Lea el resultado como máximo a los diez minutos. Sin embargo tenga presente que resultados positivos se pueden leer desde el primer minuto, dependiendo de la concentración de p30 presente en la muestra.

**7.7.6** En un resultado positivo se debe de observar la presencia de dos líneas color rosado una en el área de "T" y la otra en el área de "C". En un resultado negativo se debe observar la presencia de solo una línea color rosado en el área de "C". En un resultado inválido no se observa la presencia de una línea visible en el área de "C".

**7.7.7** En los casos que se obtenga un resultado positivo, indique la intensidad de la reacción de la siguiente forma:

**7.7.7.1** Positivo: cuando el color del área "T" sea del mismo color o más intenso que el color del área "C"

**7.7.7.2** Positivo débil: cuando el color del área "T" sea menos intenso que el color del área "C".

**Nota 2:** Todo resultado positivo débil por P30 se debe confirmar con otro montaje utilizando el mismo extracto de la muestra.

**7.7.8** Anote los resultados obtenidos para la muestra analizada en el Formulario: "Reporte de Bitácora Semen, Sección de Bioquímica" del(os) caso(s) realizando un check en la casilla correspondiente del formulario. De la misma manera puede realizar el reporte de resultados en el SADCF (Ver manual de uso del SADCF).

**Nota 3:** Todos los resultados obtenidos deben ser verificados por un analista competente. Este proceso se debe realizar según lo estipulado en el PON de Gestión de Casos e Interpretación de Resultados.

**7.7.9** Proceda a descartar la placa de prueba ABACard p30 en bolsas de polietileno de alta densidad para descarte de material biopeligroso.

**7.7.10** Limpie la mesa con alcohol 70% y/o descontaminante de ADN y ADNasas DNAway o similar utilizando papel toalla desechable.

## **8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:**

- Si no se observa la presencia de una línea visible en el área de "C" o bien, no hay migración de la muestra en la placa el resultado es considerado inválido y se deberá repetir la prueba con una nueva placa. Si el resultado de esta repetición es el mismo y los controles (positivo y negativo) presentan resultados correctos, se deberá notificar al Líder Técnico para evaluar el reporte de esta muestra como no concluyente

## **9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:**

- N/A

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 6 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

## 10 Reporte de Análisis y Resultados:

**10.1** Se debe realizar el reporte de resultados y la interpretación de los mismos de acuerdo a lo estipulado en el SADCF.

### 11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Recuerde colocarse la gabacha y los guantes antes de manipular las muestras, ya que los fluidos biológicos son fuente potencial de enfermedades por lo tanto debe manipularse según normas establecidas.

Debe asegurarse de limpiar el área de trabajo con etanol al 70% y/o descontaminante de ADN y ADNAsas DN Away o similar, antes y después de realizar las pruebas.

Sea cuidadoso con la rotulación de las placas y verifique que el número de rotulación de la misma concuerde con el número de rotulación de la muestra.

Abra un tubo eppendorf a la vez, dispense la muestra en la placa correspondiente, ciérrelo inmediatamente para evitar confusiones y contaminación.

Después de que utilizó la pipeta o dispensador para colocar la muestra en la placa, descarte en el recipiente de plástico duro Fisherbrand, de color rojo, o similar, para el descarte de material bioinfeccioso, para evitar su reutilización.

Ante una eventual contaminación con la muestra analizada proceda a lavarse la zona afectada con abundante agua de tubo y jabón, posteriormente aplíquese etanol al 70%.

### 12 Simbología:

- BQM: Bioquímica
- CT: Christmas tree
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses
- L: litros
- mg: miligramos
- mL: mililitros
- N/A: No aplica
- OT: Orden de trabajo
- ng/mL: nanogramos por mililitro
- PON: Procedimiento de Operación Normado
- SCD: Solicitud de Cambio Documental
- uL: microlitros

### 13 Terminología:

Fenómeno de Zona: Este fenómeno ocurre cuando la cantidad de antígeno es superior a la necesaria para precipitar todo el anticuerpo, por lo que se produce una reducción de la cantidad de anticuerpo precipitado, lo anterior debido a la disolución de los inmunocomplejos en presencia de exceso de antígeno (Roitt et al, 2000).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 7 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

#### **14 Anexos**

No. de Anexo	Nombre del Anexo
<b>01</b>	<b>Preparación de reactivos</b>
<b>02</b>	<b>Preparación de controles</b>

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 8 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

**Anexo No. 1**  
**Preparación de reactivos**

**Etanol al 70%**

Agregue 735 mL de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y afofe con agua destilada tipo Milli-Q o similar estéril en 1 L balón aforado estéril. Guarde en botella de vidrio estéril y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

COPIA NO CONTROLADA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 9 de 9
PROCEDIMIENTO PARA LA INVESTIGACIÓN POR SEMEN: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P30	P-DCF-ECT-BQM-11	

**Anexo 02**  
**Preparación de controles**

**Control positivo**

Entregar aplicadores a una compañera administrativa o persona que no participe en análisis para que los impregne con saliva. Secar por al menos 24h en cámara. Realizar una dilución 1/50 con muestra de semen con agua desionizada tipo Milli-Q o similar estéril. Las muestras de semen utilizadas son las recolectadas por los pacientes que se realizan espermogramas en esta Sección cuyo conteo de espermatozoides es de al menos  $15 \times 10^6$  esp/ml. Agregar 100 ul a cada aplicador seco con saliva. Secar por al menos 24h en cámara. Recortar individualmente un tubo por aplicador o máximo 2 tubos por aplicador y rotular con el # de lote. Almacenar en refrigeración. La preparación de estos controles se deberá registrar en el "Formulario para Reactivos Preparados". Al final se cuantifica el control para dar su aprobación.

**Control negativo**

Utilice un blanco de reactivos como control negativo.

COPIA NO CONTROLADA