



UNIVERSIDAD MICHOACANA
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**“VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
LA ENZIMA FOSFATASA ÁCIDA, PROTEÍNA P30 Y VISUALIZACIÓN DE
CÉLULAS ESPERMÁTICAS, EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE DE LA
PGJE”**

PRESENTA

ANDREA CEJA HEREDIA

DIRECTORA DE TESIS

M. en F. B. Elisa López Loeza

Co-DIRECTOR

Q.F.B. Jorge Galileo Ruíz Jiménez

Morelia Michoacán, Febrero 2011

AGRADECIMIENTOS

Le estoy infinitamente agradecida a cada una de las personas que me brindaron su apoyo tanto moral como profesional, para que yo pudiera llevar a cabo este trabajo de investigación y poder terminarlo satisfactoriamente; a todos ustedes mil gracias.

Le agradezco al Laboratorio de Química Forense de la PGJE de Michoacán, por las facilidades que me brindó para realizar mi trabajo de investigación, a los Químicos que trabajan en él, por su hospitalidad, amabilidad y su gran calidez humana.

Le agradezco infinitamente a la M. en F. B. Elisa López Loeza por su gran apoyo y tiempo a pesar de sus ocupaciones, el apoyo moral y profesional que me brindó para llevar a cabo mi trabajo de investigación, por la oportunidad de conocer el campo profesional que es de mi interés y que no había tenido oportunidad de explorar.

Al Q.F.B. Jorge Galileo Ruíz Jiménez, muchísimas gracias por su paciencia y su tiempo, le agradezco sus consejos, sus pláticas, experiencias, su calidez y buen humor que hicieron ameno el trabajo, así como sus experiencias, que me enriquecieron como persona.

Y a una persona que admiro y le estoy infinitamente agradecida, al M.C. Gabino Estévez Delgado, por su gran ayuda, paciencia e incondicional apoyo, por guiarme y orientarme en la redacción y estructuración de mi trabajo; por los conocimientos brindados a lo largo de esta etapa de mi vida, por las experiencias compartidas y buenos consejos que me fortalecieron profesionalmente y como ser humano. ¡Gracias!

DEDICATORIA

*É*ste trabajo es muestra de que cuando se quiere algo en la vida hay que luchar por él, sin importar cuantos sacrificios tengamos que hacer para llegar a cumplir nuestro sueño; que en el camino para lograrlo es inevitable caer, pero es una obligación levantarnos y ponernos de pie.

Este éxito no es solo mío, es también de mis padres: Elvira Heredia Sánchez y Armando Ceja Anguiano, porque sin su gran e incondicional apoyo, no lo hubiera logrado; por estar ahí para mí siempre, por su paciencia, por confiar en mí, por impulsarme a salir adelante y superarme en la vida.

A mis hermanos: Gustavo, Oswaldo, Dammy, Diego y Liz; les agradezco por tenerme paciencia, por sus palabras de apoyo y sus porras que toda la vida me han brindado; yo solo les pongo el ejemplo de que si se puede lograr salir adelante a pesar de la adversidad, no se les olvide que uno para todos y todos para uno.

ÍNDICE DE ESQUEMAS, GRÁFICAS, IMÁGENES Y TABLAS

ESQUEMAS

Esquema 1 Evaluación de la pruebas de semen potencial en la investigación en asalto sexual.....	11
---	----

GRÁFICAS

Gráfica 1 Concentración de la fosfatasa ácida a diferentes diluciones.....	78
Gráfica 1a) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:2, 1:4, 1:8.....	79
Gráfica 1b) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:16, 1:32, 1:64.....	79
Gráfica 1c) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:128, 1:256 y 1:512.....	80
Gráfica 1d) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:1024, 1:2048, 1:4096.....	80
Gráfica 1,e) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:8192 1:16384 y 1:32768.....	81
Gráfica 2 Resultados presentados al T1, en las diferentes diluciones.....	82
Gráfica 3 Resultados presentados al T2, en las diferentes diluciones.....	82
Gráfica 4 Resultados presentados al T3 en las diferentes diluciones.....	83
Gráfica 5 Resultados presentados al T4 en las diferentes diluciones.....	84
Gráfica 6 Resultados presentados al T5 en las diferentes diluciones.....	85
Gráfica 7 Concentración de proteína p30 a las diferentes concentraciones.....	90
Gráfica 7,a) Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:2 y 1:4.....	91
Gráfica 7,b) Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:8, 1:16 y 1:32.....	91
Gráfica 7,c) Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:64, 1:128 y 1:256.....	92
Gráfica 8 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:2.....	94
Gráfica 9 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:4.....	95
Gráfica 10 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:8.....	96
Gráfica 11 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:16.....	97
Gráfica 12 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:32.....	98
Gráfica 13 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:64.....	99
Gráfica 14 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:128.....	100

IMAGENES

Imagen 1: Corroboración de la muestra 17' para determinación de p30 por medio del test inmunocromatográfico.....	88
Imagen 2 :Corroboración de la muestra 1' para determinación de p30 por medio del test inmunocromatográfico.....	88

TABLAS

Tabla B.1 Modo de estructurar una tabla de contingencia 2 x 2.....	107
Tabla B.2 Ejemplo tabla de contingencia 2x2.....	109
Tabla B.3 Tabla de frecuencias para análisis de concordancia.....	110
Tabla 1 Clasificación de los establecimientos generadores para el manejo de RPBI.....	53
Tabla 2 Clasificación de tipos de RPBI para su separación y envasado.....	54
Tabla 3 Reactivos utilizados para preparación de solución 1 y 2 para la determinación de la fosfatasa ácida.....	65
Tabla 4 Reactivos utilizados para preparación de colorantes para la tinción Christmas Tree.....	69
Tabla 5 Resultados preliminares de la prueba de cribado al aplicar la técnica de identificación de fosfatasa ácida.....	71
Tabla 6 Resultados de las muestras a las que se les determino fosfatasa ácida.....	72
Tabla 7 Tabla de contingencia 2x2 estructurada de los resultados obtenidos de la determinación de fosfatasa ácida.....	76
Tabla 8 Resultados de la determinación de fosfatasa ácida a las muestras a diferentes diluciones en diferentes tiempos.....	77
Tabla 9 Resultados de la visualización de células espermáticas al microscopio, con la tinción Christmas Tree.....	86
Tabla 10 Identificación de proteína p30 en muestras de exudados vaginales.....	87
Tabla 11 Tabla de contingencia 2x2 estructurada de los resultados obtenidos en la tabla 10.....	88
Tabla 12 Relación de la concentración de la p30 a diferentes diluciones.....	90
Tabla 13 Relación del corrimiento en la inmunoelectroforesis para la p30 a diferentes diluciones.....	93

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
CAPÍTULO I: FLUIDO SEMINAL Y SU IDENTIFICACIÓN FORENSE.....	1
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis.....	7
3. Objetivos.....	7
4. Variables.....	8
5. Delimitación del tema.....	9
CAPÍTULO II: PRESENCIA DE FOSFATASA ÁCIDA, VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS Y DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO ESPECÍFICO PROSTÁTICO O PROTEÍNA p30.....	13
1. Marco referencial	
1.1. Fosfatasa ácida.....	14
1.2. Antígeno específico de la próstata (PSA) o p30.....	15
1.3. Tinción de Christmas Tree.....	20
1.4. Validación de métodos.....	21
2. Marco histórico:	
Determinación de fluido seminal y sus componentes a lo largo de la historia; aspecto bioético en el campo de pruebas forenses.....	28
3. Marco Judicial:	
Leyes, códigos y normas que se aplican para identificación forense de fluido seminal y garantizar los resultados de los métodos utilizados.....	33
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	62
Método para Fosfatasa ácida	64
Método para Inmunolectroforesis de cohete convencional modificada p30.....	66
Método para Tinción de Christmas Tree.....	68

CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE ESTUDIO SEMINOLÓGICO.....	71
Resultados de la determinación de fosfatasa ácida.....	71
Resultados de la visualización de células espermáticas.....	86
Resultados de la determinación de la proteína p30 por inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.....	87
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	101
ANEXOS.....	105
ANEXO A: Preparación de los reactivos utilizados para inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para proteína p30.....	105
ANEXO B: Estadísticos de prueba	
A) TABLAS DE CONTINGENCIA 2 X 2.....	107
B) ANALISIS DE CONCORDANCIA (INDICE KAPPA).....	110
REFERENCIAS.....	114

RESUMEN

Los órganos procuradores de justicia siguen un proceso para comprobar que se llevo a cabo un delito, por medio de la recolección de evidencia, la cual es procesada por métodos cualitativos o cuantitativos que determinan la presencia de un mensurando específico o en una mezcla donde se encuentre; enfocándonos a la identificación forense de fluido seminal, y sus componentes en los delitos de agravio sexual, por medio de 3 métodos: la determinación de la enzima fosfatasa ácida presente en fluido seminal, la visualización de espermatozoides y la determinación del antígeno específico prostático o proteína p30. Dichos métodos deben hallarse establecidos en normas nacionales, internacionales o bien métodos desarrollados por el laboratorio, que cumplan con el uso específico para el cual esta previsto; se evaluó el desempeño de los métodos utilizados, para garantizar que satisfacen la necesidad prevista por medio de parámetros que se imponen según su naturaleza, siendo nuestros métodos de naturaleza cualitativa. Para ello llevamos a cabo una validación la cual evalúa los parámetros de desempeño los cuales son: selectividad, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, límite de detección y en algunos casos repetibilidad; la naturaleza de los métodos, no permite evaluar el parámetro de incertidumbre además que el organismo de acreditación no lo exige al tratarse de este tipo de métodos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de tablas de contingencia y un test de contraste, en nuestro estudio se utilizó un test hipótesis a un grado de significancia del 95%; comprobando que nuestros 3 métodos utilizados cumplen satisfactoriamente con cada uno de los parámetros de desempeño establecidos.

CAPÍTULO I

FLUIDO SEMINAL Y SU IDENTIFICACIÓN FORENSE

1. INTRODUCCIÓN

El riesgo mundial de sufrir una violación es cuatro veces más grande en la mujer que en el hombre. La edad más frecuente es entre los 16 y 24 años edad. El tipo de victimización en orden de frecuencia es violación, abuso sexual, tentativa de violación y estupro. [1]

En consideración a lo anterior se hace necesario que los órganos de procuración de justicia tengan herramientas para el estudio científico de este tipo de problema; en nuestro caso abordaremos las técnicas empleadas por la ciencia forense para la determinación de la enzima fosfatasa ácida y la proteína p30 presentes en el fluido seminal, así mismo como la visualización microscópica de la tinción de espermatozoides. Para poder proceder en materia penal, como lo marca el Libro Segundo, Título Decimoquinto, Artículo 260 del código penal del estado de Michoacán.

Para que los órganos de procuración de justicia lleven a cabo el proceso de demostrar que se dio tal delito, realiza un proceso de recolección de muestras, evidencias, procesamiento de las mismas por diferentes técnicas o métodos que nos lleven a la determinación cualitativa o cuantitativa de un mensurando en específico o una mezcla donde se encuentre. La recolección de la evidencia debe considerar hisopos vaginales, anales, orales y peinado púbico, muestras de saliva, muestras de sangre y ropa. Las muestras deben de recolectarse en envases herméticos para que no se contaminen.[2]

El semen está constituido por espermatozoides y plasma seminal. Entre 15 a 30% del volumen del semen proviene de la próstata, 60-70% de las vesículas seminales y sólo 10% proviene del epidídimo. El plasma seminal constituye el medio líquido y la fuente nutritiva de los espermatozoides; en el hombre es una

mezcla de secreciones del epidídimo, los vasos aferentes, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper; probablemente recibe una pequeña contribución de las glándulas uretrales. [3]

El semen total es un líquido muy viscoso, de color blanco grisáceo y opalescente. Su pH varía entre 7.3 y 7.8 aun cuando puede encontrarse especímenes con pH superior a 8; sus amortiguadores fosfato y bicarbonato de sodio, contribuyen a proteger los espermatozoides contra el pH vaginal. El volumen promedio normal por eyaculación es de 2.5 a 3.5 mL disminuyendo notablemente después de varias eyaculaciones. Cuando se licua alcanzan su mayor movilidad las células espermáticas. Como elemento celular característico del semen se encuentran los espermatozoides; sin embargo, el cuadro celular es mucho más complejo: presenta células gigantes, células epiteliales, leucocitos, células prostáticas, cilindros testiculares y bacterias, contiene de 70 a 150 millones de espermatozoides por mililitro.[4]

El sustrato para la coagulación está constituido por material proteinoide secretado por las vesículas seminales; en tanto que las enzimas licuantes, fibrinolisisina y fibrinogenasa, sólo hacen contacto con el sustrato durante la eyaculación, pues son elaboradas en un lugar distante de las vesículas seminales y la próstata.

Contiene hormonas, fructosa, fosfatasa ácida y alcalina, espermina, colina, ergotioneína, ácido cítrico, lípidos, proteínas, hilauronidasa, prostaglandina, ribosa, inositol, sorbitol, flavinas, aminas, albumina, alfa y beta globulinas así como una gamma globulina, lecitina, ácidos grasos, fosforilcolina, zinc, calcio y antígeno soluble de grupo sanguíneo.[5]

El espermatozoide humano maduro mide unos 60µm de largo y es una célula con movimiento activo; esta formado por: una cabeza de forma oval vista de frente que mide 4.6 x 2.6 x 1.5 µm, y presenta forma de pera vista de perfil, con el extremo angosto orientado hacia adelante; una pieza intermedia que contiene mitocondrias y una cola formada por nueve filamentos que rodean a otros dos centrales. La mayor parte de la cabeza está ocupada por el núcleo, cuya cromatina está muy condensada; 2/3 del núcleo están cubiertos por el acrosoma.

La cola mide unos 55µm de largo y el espesor disminuye alrededor de 1µm cerca de la punta de la cola. Microscópicamente se compone de cuatro secciones: el cuello, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal, con diferencias estructurales. El núcleo es muy electrodensó y homogéneo; sobre la superficie distal, orientada hacia la cola del nucleosoma, se observa una zona especializada, la placa basal. El acrosoma rodea estrechamente los 2/3 anteriores del núcleo como una cubierta limitada por membrana que contiene hidratos de carbono. También contiene varias enzimas, de las cuales una, la acrosina, es una enzima proteolítica con características similares a la tripsina. La acrosina es importante para la fecundación. [6]

En los animales, la cabeza tiene diferente forma y dimensiones. Debido a que las bacterias atacan su tallo, primeramente en las muestras contaminadas, se hace difícil su identificación; la vida media varía, según la literatura tomada, en márgenes amplios que van desde los 30 min a las 12 horas, en otras referencias señalan encontrarlos hasta dentro de 15 días después de eyaculados, en el útero y trompas de Falopio; otros señalan que tienen vida media de 4 a 6 días, la posibilidad de encontrarlos depende fundamentalmente de que se haya realizado o no limpieza, grado de humedad, presencia de parásitos y bacterias, pH, materia fecal o sangre. La vida aproximada del espermatozoide en canal endocervical es de 114 h, en fondo del saco vaginal es de 120 h, rectal 65 h, anal 46 h y en la boca 6 h. En el caso de los niños, si no se recolecta la evidencia antes de 24 h, es mejor no recolectarla; en cadáveres no existen referencias bibliográficas en cuanto al tiempo posible de encontrarlos vivos, pero se debe considerar qué tanto puede afectarles la putrefacción. [3-4, 6-7]

Algunas enfermedades, condiciones genéticas el abuso de alcohol, drogas, la exposición a determinados agentes químicos y acciones quirúrgicas pueden reducir drásticamente el número de espermatozoides en el eyaculado.[8]

La recolección, identificación y almacenamiento de los líquidos corporales, que se lleva a cabo para muestras de semen consiste en: recolectar material sospechoso que pueda contener manchas de semen como puede ser prendas de la víctima o cualquier otro objeto que tenga relación con el hecho, si está fresca debe ser secada al aire, marcando con flechas la localización de la mancha, identificando la muestra y empaquetándola en contenedores como bolsas de papel o plástico; no es necesario presentar muestras conocidas de semen de los sospechosos por que la información necesaria para realizar análisis comparativos se pueden obtener del sospechoso que se conoce; todas las muestras a excepción de las muestras de sangre líquida, deben ser refrigerados de 2 a 4 °C durante el período comprendido entre el envasado y la presentación al laboratorio [9]. Es necesario tubos de ensaye de 15 cm de largo por 1 cm de ancho que contengan en su interior hisopos estériles, laminillas porta objetos y ampolletas de solución salina estéril.

El procedimiento consiste en tomar las muestras de la cavidad vaginal, anal, u oral, por medio de los hisopos contenidos en los tubos de ensaye, tomando éstas a la mayor profundidad posible, se les agrega 2 gotas de solución salina de NaCl; deben tomarse tres muestras como mínimo: la primera muestra se destina para hacer el frotis para visualizar al microscopio espermatozoides, la segunda muestra se destina a la determinación de fosfatasa ácida y/o determinación de proteína p 30, y la tercer muestra se destinará para futuras aclaraciones o confrontas. [4]

Todas las muestras tomadas deben llevar etiquetas con los siguientes datos:

- 1.-Número de averiguación previa o expediente
- 2.-Fecha y hora de la recolección
- 3.-Nombre de la persona a quien se le tomó la muestra
- 4.-Nombre del investigador que realizó la toma de la muestra

Las muestras obtenidas de la escena del crimen se deberán emplear para examen microscópico con objeto de identificación de espermatozoides en nuestro estudio

son: Fosfatasa ácida como prueba presuntiva de presencia de dicha enzima en el semen, la tinción de Christmas Tree (CT) y proteína p30 como prueba confirmatoria al visualizar los espermatozoides en la muestra, ya que son las que nos interesa validar, sin embargo hay muchas otras técnicas que ayudan a la identificación los componentes del fluido seminal.

En el laboratorio de Química Forense las muestras se almacenan por tiempo indefinido tanto las que dan resultado negativo a las pruebas como las positivas, esto para posibles confrontas por el defensor, o corroborar en otros laboratorios el resultado, y para cargar a la base de datos (CODIS), la información genética del agresor.

En la actualidad los investigadores de genética forense, encuentran la posibilidad de poder identificar plenamente al agresor, comparando la muestra obtenida de la víctima ya fuere de la cavidad bucal, vaginal o anal, con el semen del presunto agresor, para ello se basan en la comparación del ADN obtenido de la víctima y del ADN de agresor. Como sabemos el ADN es el conjunto de marcadores genéticos, el material genético esta contenido en 46 cromosomas del núcleo celular y en el ADN mitocondrial. Este solo es heredado al hijo por la madre, ya que durante la fecundación, no pasa al óvulo, en virtud de que a él solo entra la cabeza del espermatozoide, y el ADN mitocondrial, se encuentra en el cuello de la célula espermática.

Todas las células que conforman a un individuo proceden de una sola célula, el cigoto, la cual se origina en la fertilización al unirse las células sexuales: el ovulo y el espermatozoide, que los contienen en su núcleo, 23 pares de cromosomas homólogos; 22 de ellos son autosomas y un par de cromosomas sexuales o gonosomas: XX en la mujer y XY en el hombre. Los cromosomas son portadores de los genes, constituyéndose en estructuras celulares de gran importancia en la transmisión de material genético durante la reproducción. El locus, lugar, es la ubicación exacta del gen, en el cromosoma; los genes son fragmentos de ADN, de

los cromosomas que codifican a las proteínas, las cuales intervienen integralmente en las funciones y estructuras, del conjunto de las células del cuerpo humano.

El ADN humano contiene aproximadamente entre 50 y 100 mil genes diferentes, los genes están localizados en locus particulares de los cromosomas y muchos de ellos pueden existir en formas variables llamadas alelos, que difieren en la secuencia de nucleótidos del ADN. La identificación en materia de genética forense se basa en la caracterización de las regiones variables o polimórficas del material genético del individuo; con ayuda de marcadores genéticos que pueden ser útiles deben ser muy polimórficos; tener una frecuencia alélica y genotípica muy baja y un gran poder de discriminación o capacidad de distinguir dos personas.

Los sistemas más comúnmente utilizados en genética forense son: el HLA DQ alfa, el Polymarker que tiene 5 marcadores, y el minisatélite D1S80, en total 7 marcadores que dan un porcentaje de exclusión del 99.972%, en la práctica el orden que se sigue cuando se analiza una muestra de esta naturaleza y se tiene con la que se va a comparar es:

- 1.-Extracción del ADN
- 2.-Cuantificación del ADN extraído a través de electroforesis horizontal
- 3.-Estudio en regiones hipervariables por:
 - a) Hibridación y Southern-blotting de RFLP.
 - b) Amplificación por PCR es la que se utiliza más en el laboratorio.
 - c) Secuenciación de ADN mitocondrial.

Aunque el análisis del ADN es un tanto tedioso y conlleva más tiempo, los resultados obtenidos son más significantes e informativos, lo que llevan al investigador a una conclusión más exacta sobre los resultados.[4, 10-11]

2. HIPÓTESIS

El laboratorio debe de aplicar métodos normalizados que satisfagan las necesidades de la persona que solicita el análisis; para ello el método debe ser apto y tener un buen desempeño para el fin que se le requiere, por ello es necesario e indispensable evaluar los parámetros de desempeño del método en cuestión, la evaluación de dichos parámetros se puede dar por medio de una validación del método; para garantizar que es apto para el uso específico previsto.

“Las técnicas espermáticas: fosfatasa acida, inmunolectroforesis de proteína p30 y Tinción Christmas Tree, utilizadas para la determinación cualitativa de la enzima fosfatasa ácida, la proteína p30 y espermatozoides presentes en el flujo seminal tienen un buen desempeño consistente, en el laboratorio de química forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado.”

3. OBJETIVOS

Es un requisito indispensable del laboratorio comprobar que los métodos utilizados cumplan con los parámetros de desempeño, establecidos en las normas para garantizar así mismo los resultados obtenidos de los cada uno de los métodos; la evaluación del desempeño se hace por medio de una serie de pasos, que nos llevan desde la descripción del método, su función o uso para el cual es previsto, sus características, la evaluación del método por medio de diferentes parámetros que miden el desempeño, hasta la expresión y análisis de los resultados para llevar a cabo su validación.

Objetivo General: Medir el desempeño de las técnicas utilizadas en el análisis espermático como la presencia de la enzima fosfatasa acida, la proteína p30 y tinción de espermatozoides por la tinción de Christmas Tree.

Objetivos Específicos o particulares: llevar a cabo la validación total de cada una de las técnicas anteriormente mencionadas, para comprobar y certificar con evidencia documentada, que las técnicas cumplen y se desarrollan dentro de los intervalos definidos por las guías de validación.

4. VARIABLES

Existen factores que afectan de manera directa o indirectamente el resultado del método o la garantía del mismo; ya que causan interferencias con el mensurando o sustrato de nuestro interés afectando su concentración ya sea incrementándola o disminuyéndola, arriesgando su presencia, alterando su estado en la muestra. Dichos factores pueden depender de la víctima, del victimario o bien de la persona encargada de la recolección de la muestra, almacenamiento, transporte, manipulación y proceso de la misma.

Variables Dependientes:

- Sujeto
- Edad
- Tiempo
- Enfermedades
- Hábitos
- Tipo de muestra
- Agresor que se haya realizado la vasectomía

Variables Independientes:

- Toma de muestra
- Condiciones ambientales
- Reactivos
- Método usado para la determinación
- Interferencias
- Contaminación de la muestra

5. DELIMITACIÓN DEL TEMA

El estudio fue realizado en el laboratorio de químico forense de la Procuraduría General del Estado. Dado que el tiempo de desarrollo de cada una de las técnicas varía de una a otra en lapso de minutos:

- Refiriéndonos a la fosfatasa ácida alrededor de 15 y 20 min por que hay que preparar las soluciones que forman el reactivo para la determinación de dicha prueba, si ya se tiene el reactivo es cuestión de 5 min para realizar la prueba.
- La tinción lleva un lapso de 20 a 30 min, por que hay que hacer el frotis y dejarlo reposar de 15 a 20 min en cámara húmeda, y se llevan a cabo varios lavados al frotis. En caso de preparar los colorantes se lleva entre 40 y 60 min extras por la pesada de los reactivos y la preparación de las soluciones colorantes.
- En el caso de la proteína p30 es más tardado cerca de las 4 horas y media desde que se prepara el agar en gel de agarosa hasta que se termina de correr la inmunoelectroforesis.

Existe muchos métodos en la ciencia forense que nos llevan al mismo resultado: la determinación de que la muestra sea o no liquido seminal, técnicas orientativas, y a la identificación específica del espermatozoide, antígenos o enzimas presentes en el liquido seminal, técnicas confirmatorias.

Algunas de las técnicas o procedimiento que se llevan a cabo son: [11]

- La luz ultravioleta de Wood donde las manchas de esperma dan una fluorescencia blanco- amarillenta, que va ganando color amarillo con el tiempo; el inconveniente es que la fluorescencia puede estar ausente si la mancha a sido tratada con detergente; esta técnica es orientadora y de localización.
- Técnicas de diagnóstico genérico: es la investigación de espermatozoides, la espermina y la colina.
- Tinciones: dependiendo de la tinción pueden ser varios colorantes como: hematoxilina-eosina, azul de metileno-fuchina, eritrosina amoniacal-azul de

metileno, colorante de Gram, reactivo de Linchtwitz-Thiery o May-Grunwald-Giemsa o tinciones de plata y tinción Christmas Tree.

- Pruebas cristalográficas que persiguen la formación de cristales específicos: reacciones de Florence, de Barderio, de De Dominics, de Pérez Vallamil, de Guarino y de Puranen.
- Técnicas electroforesis-cromatografía
- Técnicas enzimáticas: fosfatasa ácida (técnica por inhibición de la enzima con ácido L- tartárico), determinación cualitativa de la fosfatasa ácida prostática por medio de hidrolización con la timolftaleína sódica monofosfatada, liberando la timolftaleína y con la adición de un álcali termina la reacción enzimática y da una coloración azul proporcional a la cantidad de enzima prostática que se mide en un espectrofotómetro para inmunoensayo enzimático a 590 nm.
- Técnicas inmunológicas: antígeno de revestimiento, antisuero- anti-fosfatasa ácida, antígeno prostático específico.
- La dosificación de Zn, Ca, Cu, Fe, K y Mg por espectrofotometría de absorción atómica, permite obtener conclusiones validas para el diagnostico del esperma.

Para nuestro estudio solo utilizaremos las técnicas orientativas de fosfatasa ácida, y las técnicas confirmatorias de la tinción de Christmas Tree y p30 o antígeno prostático específico. En el esquema 1 se muestra las pruebas para la evaluación de semen en el ámbito forense:

ESQUEMA 1: evaluación de la pruebas de semen potencial en la investigación en asalto sexual

Prueba de detección:	Pruebas confirmatorias:	Individualización de las pruebas de semen
<ul style="list-style-type: none">• Ultravioleta luz de la exploración• Pruebas químicas presuntivas para el semen• La colina (prueba de Florencia) y espermina• Fosfatasa ácida (prueba Brentamine)	<ul style="list-style-type: none">• Espermatozoide Móviles• No móviles• Proteinasa K• Hibridación in situ fluorescente (FISH)• Tinciones de células espermáticas• Pruebas no celulares del semen<ul style="list-style-type: none">• Fosfatasa ácida p30• Antígeno de revestimiento	<ul style="list-style-type: none">• Grupo sanguíneo escribiendo<ul style="list-style-type: none">• ABO (H) del sistema Lewis antígenos• Enzima escribiendo<ul style="list-style-type: none">• Fosfoglucomutasa (PGM)• Una peptidasa (Pep A)• ADN

Las agresiones sexuales son consideradas un delito de acuerdo al código penal y procesal del estado de Michoacán, para que el delito sea procesado en materia de lo penal se requiere que se compruebe de manera científica que el delito se llevo a cabo; para ello la ciencia forense realiza una secuencia de pruebas para la determinación de evidencias tomadas de la víctima para comprobar que se llevo a cabo dicho acto o delito; en nuestro caso se toman en cuenta las técnicas que nos lleven a la determinación de presencia de fluido seminal enzimas, proteínas y/o presencia de espermatozoides con la ayuda de tres técnicas principalmente: Fosfatasa ácida, Proteína p30 y Tinción Christmas Tree; que son técnicas cualitativas y se complementan con el análisis del ADN de la muestra tomada de la víctima y se compara con la del presunto agresor, esto ayuda a la identificación plena del agresor y conlleva a una conclusión más exacta y fundamentada.

La muestra utilizada para nuestro análisis, puede venir de diferentes partes y/o cavidades del cuerpo, lo que se busca es en si los componentes del liquido seminal excretado por el agresor, la muestra debe ser tomada adecuadamente por un experto para ser procesada con un método que asegure la integridad y calidad

del resultado. Por ello estas técnicas o métodos deben cumplir con los requerimientos establecidos en la guía de validación para que sea garantía que las técnicas cumplen con los parámetros de desempeño que caen dentro de las especificaciones que indican que se está trabajando correctamente y están calibrados adecuadamente. Con lo cual se garantiza que los resultados obtenidos son de calidad y no son cuestionables.

Y aun que existen muchas más metodologías que ayudan a la identificación del líquido seminal, de sus componentes como lo son enzimas, antígenos, y compuestos; son estas tres técnicas anteriormente mencionadas las que se utilizan en el laboratorio de química forense de la Procuraduría General del Estado que son las que nos interesa validar; ya ello debemos de seguir un protocolo establecido en las guías de validación para determinar que cada una de las técnicas utilizadas se desarrollan dentro de los intervalos definidos, teniendo la especificidad, sensibilidad y repetibilidad que cae dentro de lo establecido por las guías de validación.

CAPÍTULO II
PRESENCIA DE FOSFATASA ÁCIDA, VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS
ESPERMÁTICAS Y DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO ESPECÍFICO
PROSTÁTICO O PROTEÍNA p30

La fosfatasa ácida es una técnica de orientación utilizada para determinar la presencia de esta enzima en la muestra y la p30 o antígeno prostático específico se realiza como técnica de confirmación esto cuando ocurre una eyaculación aun cuando el agresor se ha practicado la vasectomía; complementándose con la técnica de la tinción Christmas Tree donde se determina la presencia de espermatozoides. Para poder llevar estas pruebas tenemos que tener bases sobre las cuales aplica el derecho y obligación de llevarla a cabo, respetando lo establecido por la Leyes federales y/o estatales según la magnitud del agravante; así mismo respetando las garantías individuales de cada individuo para no faltar a las normas y leyes que establece nuestra sociedad, así como el reglamento mismo que lleva el organismo en este caso la Procuraduría General de Justicia del Estado.

Así mismo garantizar que las pruebas que realizamos cumplen con las especificaciones las cuales demanda el cliente, estas pruebas deben ser validadas con evidencias objetivas que determinen que se cumplen con los requisitos específicos para el uso específico de cada uno de los métodos, esto queda establecido por la NMX-EC-17025-IMNC-2006 establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración y la NMX-EC-15189-IMNC-2008, que establece los requisitos particulares para la calidad y la competencia entre laboratorios clínicos, en estas normas se basa la Entidad Mexicana de Acreditación, ema, quien es el organismo encargado de evaluar que los métodos sean validados.

En nuestro ambiente de trabajo, se tiene que tener la precaución con el material que manejamos, material de laboratorio, equipo, muestras; ya que no estamos exentos de un accidente de trabajo, hay reglamentos que tenemos que seguir para

poder realizar con orden, y cautela nuestro trabajo para garantizar que lo que hacemos lo hacemos bien sin atentar la salud de otros y la nuestra.

1.-MARCO REFERENCIAL.

DETERMINACIÓN FORENSE DE ENZIMA FOSFATASA ÁCIDA, CÉLULAS ESPERMÁTICAS, Y PROTEÍNA p30

Las técnicas utilizadas: técnica para la determinación de la enzima fosfatasa ácida, visualización de espermatozoides y determinación de proteína p30, son el objeto para llevar a cabo nuestra validación con el fin de evaluar el desempeño de nuestras técnicas para garantizar que son aptas para el uso que se tiene previsto, y a su vez garantizar los resultados que se obtienen de cada una de ellas; son tres:

1.1.-Fosfatasa ácida: Es una fosfomonoesterasa no específica, segregada por la glándula prostática, está presente en grandes cantidades en el flujo seminal. Es una enzima que cataliza la hidrólisis de ciertos fosfatos orgánicos, ésteres alifáticos y aromáticos del ácido orto fosfórico. Su localización es muy ubicua no sólo en otros tejidos humanos sino también en animales y plantas; pero con mayor concentración se encuentra en el plasma seminal en concentraciones de 20 a 400 veces más que en otros fluidos.[4, 12]

Su identificación es de mucha ayuda en casos de violación, sin embargo la presencia del semen debe confirmarse en forma adicional por otro método como: 1) la identificación microscópica de espermatozoides, 2) antígeno específico de vesículas seminales y /o 3) la confirmación del antígeno prostático (proteína P30).

El principio de los métodos se basa en que la fosfatasa ácida, cataliza en medio ácido la hidrólisis del alfa-naftil fosfato, ya que la fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; éste reacciona con sulfato de dianiziltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso. Se basa en que está cataliza en medio ácido la hidrólisis del alfa-naftil fosfato. En algunos métodos se les adiciona pentanodiol, para acelerar la reacción al actuar como aceptor del fosfato. El tartrato se puede emplear como inhibidor

específico de la denominada fracción prostática. Una reacción positiva significa la presencia de la fosfatasa ácida. Ya que la fosfatasa ácida no solo existe en líquido seminal es importante señalar que esta prueba positiva no es concluyente ya que puede encontrarse también en bacterias, leche humana, hígado humano, orina humana, riñón humano, exudado vaginal, glóbulos rojos, coliflor, trébol, cereal de arroz, semillas de alfalfa, veneno de víbora, almendras dulces, coles de Bruselas, caracoles y moho de hongos. [3-4]

La reacción positiva significa la presencia de fosfatasa ácida por lo que la prueba se interpreta como la presencia de semen.

Esta enzima es muy lábil y pierde actividad dentro de las primeras 10 horas. Los resultados falsos positivos se pueden presentar cuando se encuentran presentes en los indicios contaminantes bacterianas como E. Coli, Proteus y levaduras. [8]

Su detección se basa en una reacción cromática de la enzima fosfatasa ácida, muy abundante en la secreción genital masculina. La fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; éste reacciona con sulfato de dianiziltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso. La aparición de una coloración violeta intensa en la muestra problema, dentro de un tiempo no mayor a 5 min, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 U.K.A. y por lo tanto la muy probable presencia de semen; en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color arriba señalando, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo. [4]

1.2.- Antígeno específico de la próstata (PSA) o p30: Es una glicoproteína sializada que se origina en la próstata desde el punto de vista bioquímico es de una sola cadena con 93% de aminoácidos y 7 % de carbohidratos; contiene 240 residuos de aminoácidos y 4 cadenas laterales de carbohidratos; el amino terminal es una leucina y el carboxilo terminal corresponde a prolina, presenta varios puntos isoeléctricos que van de 6.8 a 7.2 debido a sus formas isométricas, su peso molecular corresponde a 30,000 Dalton, la vasectomía no afecta su

presencia en el líquido seminal; su principal función es licuar el líquido seminal. Su rango de concentración varía entre 300 y 400 µg/ mL de semen. El PSA se encuentra en bajas concentraciones en la leche materna 1ng/mL; en orina femenina se han encontrado valores entre 0.12-1.06 ng/mL; a diferencia de las secreciones antes mencionadas, en semen el promedio de PSA es de 820 000 ng/mL.

Al comparar los métodos citológicos con la medición de fosfatasa ácida y la cuantificación de PSA a dos diferentes tiempos (0 y 24 h), se ha reportado una sensibilidad para las tres pruebas, al tiempo 0, de 67.5 y 99.4 %, respectivamente, en comparación con las 48 h, la fosfatasa ácida, baja a 40.3% y el PSA disminuye discretamente a 96%. Se puede encontrar en muestras vaginales todavía a las 27 h de ocurrido la eyaculación mientras que la fosfatasa ácida desaparece a las 14 h en promedio después de la eyaculación. Esta proteína puede ponerse de manifiesto por medio de la técnica electroforética (inmunolectroforesis), actualmente se dispone de un antisuero comercial en kits comerciales. En los últimos años se ha perfeccionado el método utilizando la técnica de ELISA para poner en evidencia el antígeno prostático. Además el PSA proporciona buenos resultados cuando la muestra proviene de sujetos oligospermáticos o azospermáticos.[3, 12-13].

Esta gran cantidad y de hecho el que el PSA se encuentre solamente a muy bajas concentraciones en el fluido vaginal femenino (0.4-0.9 ng/mL y 0.0-1.25 ng/mL respectivamente), hace del PSA un interesante marcador en ciencias forenses para la detección incluso de pequeñas cantidades de fluido seminal. [4, 6]

Las ventajas de una determinación de PSA son:

- La detección de espermatozoides es posible en casos donde no deben encontrarse espermatozoides (por ejemplo hombres vasectomizados).

- Pequeñas cantidades de esperma pueden ser registradas. Estudios de MACALUSO y otros (1999) indican, que una cantidad de sólo 10 µL de esperma incrementa la concentración de PSA en el fluido vaginal 200 veces.

- El PSA tiene una buena estabilidad. En un frotis vaginal es detectable aproximadamente entre 14-47 horas después del coito. También en manchas de 30 años de antigüedad, el PSA puede ser recuperado a concentraciones detectables en test de membrana. [14]

- El PSA es un marcador, el cual es más específico que el test de fosfatasa ácida. Se a visto que la concentración de PSA en suero humano es normalmente bajo (<4 ng/mL) y está elevado solamente en el caso de enfermedades prostáticas hasta 200 ng/mL, la cantidad de PSA en orina de hombres sanos muestran en algunos casos valores de 800ng/mL valor estimado.

Una diferenciación entre fluido seminal y orina puede ser posible por la determinación de concentraciones de PSA. El más alto grado de dilución en orina de hombres con un resultado positivo de PSA reportado es 1:200. Por otro lado, muestras de semen generalmente dan resultados positivos de PSA incluso a factores de dilución de 1: 200,000; esto es a 1000 veces mayor a la mas alta dilución la proteína p30 es más estable en manchas de semen en ropas u otros indicios que estén secos y no hayan sido lavados. [12, 15]

Estudios indican que niveles bajos de PSA son detectables en la orina de chicos de 11 años. Normalmente las concentraciones de PSA en los otros fluidos corporales son bajas, por tanto una interferencia con la interpretación del resultado del test es prácticamente imposible trabajando con materiales diluidos/extraídos.[16]

Es detectada mediante inmunocromatografía, la cual es una técnica muy sensible y específica para ello existen en el mercado test comerciales de diagnostico *in vitro*, en cassette es un inmunoensayo cromatográfico contiene 2 anticuerpos monoclonales murinos anti PSA como componentes activos. Uno de estos anticuerpos está inmovilizado en la zona del test de la membrana. La zona control y la zona del estándar interno (entre zona control y zona del test) contiene

anticuerpos policlonales anti ratón obtenidos en cabra. La cantidad de anticuerpo de estándar interno está ajustada a la intensidad de color de la línea, la cual es igual a la intensidad de color de la línea del test a una concentración de PSA de 4 ng/mL.

Un bloque de fibra de vidrio en la parte baja de la membrana es utilizado para la carga de la muestra y la transmisión a un segundo bloque de fibra con un segundo anticuerpo monoclonal murino anti PSA marcado en oro y desecado. El PSA de la muestra se unirá al anticuerpo marcado con oro y formará un complejo PSA-anti PSA marcado con oro.

A través del efecto de capilaridad de la membrana, la mezcla de reacción incluyendo el complejo es transportado hacia arriba con el fluido. En cualquier caso, el anticuerpo coloreado anti PSA marcado con oro se unirá al anticuerpo anti ratón en la zona control y la zona del estándar interno desarrollando dos líneas rojas (una en la zona control y otra en la región del estándar interno). Estas dos líneas son independientes de la existencia de PSA en la muestra e indican solamente que la ejecución del test ha sido correcta. Si la muestra contiene PSA, el complejo PSA-anti PSA marcado con oro se unirá al anticuerpo monoclonal inmovilizado de la zona de resultado del test que reconoce otro epítipo en la molécula de PSA, complejo sándwich. La unión se muestra por la formación de una línea adicional. Así en una muestra positiva para PSA, aparecerán tres líneas coloreadas en la ventana de resultados. La línea que aparece en medio (estándar interno) correlaciona con la cantidad de 4 ng/mL de PSA. Un ejemplo de este tipo de test es Test PSA SEMIQUANT de SERATEC®. [17]

El método que se utiliza en nuestro estudio es la inmunoelectroforesis de cohete convencional que consiste en que, el antisuero (Ac) se incorpora al gel de manera que el Ac no pueda migrar. En el gel se realizan unos pocillos (generalmente en el cátodo) que se rellenarán con la muestra o con diluciones patrón. Una vez depositadas éstas se activa el campo eléctrico. El antígeno (Ag) se desplaza en la agarosa y precipita al encontrarse con el Ac.

La precipitación va produciéndose a medida que el Ag avanza hacia el ánodo de manera que al ir disminuyendo la concentración de Ag los bordes laterales se van acercando hasta unirse. Así, se produce una precipitación triangular (en estela de cohete).

La concentración de Ag de la muestra es directamente proporcional al área y altura del triángulo. Comparando los resultados de la muestra con los obtenidos en las diluciones patrón obtendremos un resultado cuantitativo. [18]

El método utilizado en nuestro estudio fue la inmunoelectroforesis de Cohete convencional o electroforesis de Rocket adaptado para la determinación de la proteína p30; esta metodología consiste en una comparación de la muestra que se presume es líquido seminal y contiene la proteína con una serie de diluciones de una concentración conocida de la proteína, y requiere un antisuero monoespecífico contra la proteína p30. Las muestras que se comparan cargándolas en los pequeños pozos circulares a lo largo del borde de un gel de agarosa que contiene el anticuerpo monoespecífico para la proteína, se utiliza el gel de agarosa por tener poros mas grandes que los del gel policramida y pueden separar moléculas de mas de 500 KDa. Las muestras, con el antígeno, son manipuladas por electroforesis en el gel de agarosa, donde la interacción entre el antígeno y el anticuerpo se lleva a cabo; tomando en cuenta que la cantidad de carga neta en la molécula es variable y depende del pH del amortiguador, si el pH del medio es superior al punto isoeléctrico de la proteína esta se comportará como anión, la carga de la proteína se hace más negativa a medida que el pH del amortiguador se hace más básico, el tampón utilizado es de pH 9.1.

A medida que el antígeno de la proteína comienza a salir del pozo y entrar en el gel, las moléculas de antígeno comenzará a interactúan y se unen a las moléculas de anticuerpos; las proteínas con carga positiva migran hacia el cátodo, las de carga negativa hacia el ánodo, hasta alcanzar el pH isoeléctrico donde la proteína es estable sin límite de tiempo.

En este paso del proceso hay una considerable exceso de antígeno más anticuerpos y la precipitación no se produce. Sin embargo, como la muestra de

antígenos pasa a través de la electroforesis en gel, más moléculas de anticuerpos son encontrados e interactúan con el antígeno, hasta que finalmente anticuerpo y antígeno presentan suficiente reticulación (es decir la formación de una red tridimensional formada por la unión de las diferentes cadenas poliméricas) de tal manera que la "equivalencia" se alcanza y el antígeno – anticuerpo en exceso forma precipitados. En ocasiones se puede ver algún tipo de línea de precipitación aparecen en el gel. En el gel se ve la forma de un "cohete", la mayoría de los precipitado antígeno-anticuerpo es de hecho a la cabeza de este cohete, pero la precipitación fina líneas por el lado de los cohetes están formados por una pequeña cantidad de antígeno que se difundió hacia los lados cuando el antígeno pasa a través del gel. Esta pequeña cantidad de antígeno muy rápidamente se reúne de anticuerpos suficiente para alcanzar la equivalencia y precipitado. Cuanto mayor sea la cantidad de antígeno cargado en un pozo, más el antígeno tendrá que viajar a través de el gel antes de que pueda interactuar con los anticuerpos suficientes para formar un precipitado.[19-20]

Por lo tanto, si una serie de pozos se cargan con la concentración de antígeno cada vez mayor, una serie de cohetes de mayor altura debe ser producida, con el área bajo la curva, cohete, que es proporcional a la cantidad de antígeno en el pozo. Dado que los cohetes son triángulos isósceles casi perfectos, la altura del cohete es también proporcional al área bajo la curva, y por tanto la concentración de antígeno, y esto es lo más fácil ya que es el parámetro que normalmente se registra.

1.3.-Tinción de Christmas Tree (CT, tinción de árbol de navidad o tinción de rojo rápido nuclear/ picroindigocarmine); en esta tinción específica para espermatozoides, el núcleo de cabeza de los mismos se observan de color rojo y las colas y el acrosoma de color verde, por lo que es conocida como tinción de "Christmas Tree".

La muestra teñida es observada al microscopio escrupulosamente, buscando y cuantificando los espermatozoides presentes. Por la naturaleza de la muestra con

que se cuenta y el tratamiento que se le da en la preparación de los extractos, es posible observar morfologías atípicas tales como la ausencia de cola, razón por la cual es necesario que peritos debidamente formados y con experiencia sean los que realicen este tipo de análisis.

El tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad vaginal cambia dependiendo de, entre otras variables, si la ofendida se encontraba con la menstruación o con infecciones vaginales, el pH vaginal, el lavado vaginal, el ejercicio físico y la cantidad de espermatozoides en el eyaculado. Por su parte factores como la defecación, afectan el tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad anal. La mezcla de estas variables hace que en general, los espermatozoides puedan detectarse en vagina hasta tres días después del coito. Sin embargo en la literatura relacionada con la investigación forense, se han observado algunos casos en los cuales los espermatozoides han sido detectados hasta seis días después del coito. [21]

Como vimos en el capítulo anterior la morfología del espermatozoide y su pH básico nos ayudan a comprender el fundamento de esta técnica, ya que tiene que ver con los colorantes utilizados los cuales son basófilos, el colorante rojo rápido nuclear tiene gran afinidad por los núcleos celulares, cromatina, tiñéndolos de rojo, el colorante índigo carmín tiene afinidad por las fibras de colágeno y glicógeno tiñéndolas de color verde-azulado.[22-23]

1.4.- Validación de Métodos

Necesitamos confirmar que nuestras técnicas utilizadas para la determinación de presencia de la proteína p30, la enzima fosfatasa ácida en el fluido seminal y la tinción de espermatozoides por medio de la tinción Christmas Tree cumplen con las capacidades de desempeño consistentes con las que se requiere cumplan la aplicación que se impone. Para ello es necesario evaluar las capacidades de desempeño de cada una de las técnicas utilizadas, la evaluación se realiza por medio de una validación de método.

La validación ha ido tomando mucho interés por que es requerida en normas sobre sistemas de gestión de calidad para la acreditación. Para llevar a cabo la validación de los métodos utilizados, en este caso nuestros métodos llevados a cabo en el laboratorio de química forense; nos basamos en la Norma Mexicana – NMX-EC-17025-IMNC-2006 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* y NMX-EC-15189-IMNC-2008 *laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la competencia*.

Primeramente “la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen con los requisitos particulares para un uso específico previsto” [24]. “Una acreditación es una atestación de tercera parte relativa a un organismo de evaluación de la conformidad que se manifiesta la demostración formal de su competencia para llevar a cabo tareas específicas de evaluación de calidad” [25].

El laboratorio debe realizar las pruebas que satisfacen las necesidades del cliente que sean apropiadas a las técnicas que realiza el mismo, pero que de preferencia sean técnicas o métodos establecidos en normas ya sea nacionales o internacionales ; es por ello que el laboratorio debe confirmar que puede aplicar los métodos antes de utilizarlos ya sean normalizados, no normalizados o desarrollados, el o los métodos deben haber sido validados antes de su uso para así considerarlo capaz de cubrir con las especificaciones establecidas en la norma.

Nuestros métodos aplicados para la determinación de presencia de fosfatasa ácida y proteína p30 en el fluido seminal así como la determinación de presencia de espermatozoides con la tinción Christmas Tree son métodos cualitativos es decir aseguran la presencia o ausencia de uno o más mensurandos en una muestra considerando sus propiedades físicas, biológicas o químicas cuya respuesta es la presencia o ausencia de un mensurando con respecto a un nivel de concentración, detectado en forma directa o indirecta en una muestra.

La validación se lleva a cabo comparando el método contra la característica de referencia exacta, el procedimiento se lleva al aplicar el mismo número de muestras positivas verdaderas y muestras negativas verdaderas. El resultado de este tipo de métodos suele ser si/no, positivo/ negativo es decir una respuesta binaria, la evaluación del método cualitativo o no cuantitativo se lleva a cabo corroborando que el material y los reactivos utilizados en el método para la obtención de los datos funcionen adecuadamente, entonces se evalúan los siguientes los parámetros de desempeño:

- *Selectividad*: para evaluar únicamente el mensurando de forma exacta y específica, en presencia de los componentes como impurezas, contaminación, productos de degradación, etc. Es decir hasta qué punto las interferencias presentes en la muestra afectan considerablemente nuestro resultado; para determinar la homogeneidad se puede utilizar las tablas de contingencia.
- *Sensibilidad*: es “el cambio en la respuesta de un instrumento dividido por el correspondiente cambio del estímulo” [26]. Es la probabilidad de que el resultado analítico resulte positivo cuando en la muestra este presente el sustrato o mensurando de nuestro interés en los límites de detección o por arriba de ellos. Si la sensibilidad es < 0.95 el método no tiene buena sensibilidad y si es ≥ 0.95 el método tendrá buena sensibilidad.
- *Especificidad*: que es la propiedad de un método de responder exclusivamente al mensurando definido. Se maneja como la probabilidad de que el resultado analítico resulte negativo debido a que el sustrato o mensurando de nuestro interés no está presente físicamente en la muestra o se encuentra por debajo de los límites de detección. Si la especificidad es < 0.95 el método no tiene buena especificidad y si es ≥ 0.95 el método tendrá buena especificidad
- *Valor predictivo*: Se determina los dos valores predictivos: el valor predictivo positivo que es la probabilidad de que el sustrato o mensurando este físicamente presente en la muestra o se encuentre en una cantidad muy mínima pero detectable cuando la prueba resulto positiva. El valor

predictivo negativo: es la probabilidad de que el sustrato o mensurando no este físicamente presente en la muestra o se encuentre debajo de los límites de detección cuando la prueba resulto negativa.

- *El límite de detección:* que es la cantidad más baja que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas en el laboratorio, esta prueba de límite de detección solamente fundamenta que cantidad del mensurando está por encima o por debajo de un nivel de significancia; es posible estimar este parámetro diluyendo la muestra a concentraciones susceptibles de encontrarse en nuestras condiciones del laboratorio. Será entonces la cantidad mínima de sustrato o mensurando presente en la muestra, que bajo las condiciones del método genere una respuesta positiva por medio de nuestro método.

Otros parámetros que también se pueden evaluar, pero dependen de la naturaleza del método y de la muestra lo permiten:

- *La repetibilidad:* es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando o sustrato realizadas bajo las mismas condiciones de medición.
- *La trazabilidad:* es el resultado de una medición por la cual puede ser relacionada con una incertidumbre determinada, esto a referencias establecidas generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena de comparaciones. Para métodos cualitativos tiene algunas consideraciones ya que por lo general no existen Materiales de referencia Certificados (MRCs) para métodos cualitativos y si se pretende aplicar es complicado por la naturaleza de las muestras, además que los métodos cualitativos siempre tienen una comparación frente a métodos de referencia los cuales suelen ser cuantitativos.

[27-28]

- *incertidumbre del método:* esta asociada al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando o sustrato que es de nuestro interés al cual

se le aplica nuestro método. En la Ley Federal de Metrología y Normalización (LFMN) las referencias para la trazabilidad son principalmente a patrones de magnitudes físicas, siendo que existen pruebas en el área biológica y química que son cualitativas o que utilizan unidades fuera del SI que no pueden ser trazables es decir, que no se les puede determinar la incertidumbre y la estabilidad por la naturaleza del mensurando que se determina, sin embargo se debe establecer ante la autoridad evaluadora del método que no se puede exigir la trazabilidad de la medición, pero no significa que no se tiene un procedimiento de evaluación que asegure el desempeño y buen funcionamiento del método en cuestión. [29-30]

En la política para la estimación de incertidumbre de la ema, del manual de procedimientos para la determinación de la incertidumbre en las mediciones se manifiesta que el laboratorio de ensayo debe tener y aplicar procedimientos para estimarla, sin embargo en algunos caso la naturaleza del método puede excluir el método riguroso y además tedioso, metrológicamente y estadísticamente validó para la determinación de la incertidumbre; sin embargo debe por lo menos tratar de identificar todos los factores de la incertidumbre o componentes de la misma para hacer una estimación razonable basándose en el desempeño del método y en el alcance de la medición, para ello puede hacer uso de los datos de validación anteriores o bien de la experiencia misma del laboratorio. Una estimación razonable se debe basar en el conocimiento de los parámetros del método de medición, describiremos los 3 casos para realizar la estimación razonable:

- I. Cuando el método de medición se haya validado dentro del laboratorio, por ejemplo un análisis de varianza, a través de la variabilidad total, considerada a partir del muestreo, pre tratamiento de la muestra, transporte de la muestra, material de referencia certificado.
- II. Cuando existan datos provenientes de mediciones de control de calidad interno, lleva varios meses, 20 mediciones independientes del material de control de calidad para obtener la precisión intermedia del método.

III. Pruebas inter-laboratorio para determinar los parámetros de desempeño de un método, aquí los errores sistemáticos de cada uno de los laboratorios se vuelven aleatorios.

Esta información debe estar disponible cuando se requiera para sustentar la validez y veracidad del resultado del ensayo o método, esto cuando exista una solicitud expresa del cliente o bien cuando la incertidumbre afecte el cumplimiento de una especificación, es decir debe haber un aseguramiento de la calidad de los procedimientos de examen.

El laboratorio debe confirmar que puede operar adecuadamente métodos normalizados antes de implantar los ensayos o calibraciones. Debe validar métodos no normalizados, métodos diseñados/ desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su alcance presupuesto y aplicaciones y modificaciones de métodos normalizados para confirmar que los métodos se ajustan al uso propuesto. La validación debe ser tan extensiva para satisfacer las necesidades de la aplicación de campo.

Los elementos en un proceso de validación son:

- herramienta u objeto de validación;
- la función o uso previsto;
- las características de la herramienta;
- la actividad de examinar;
- la expresión del resultado.

Los diferentes parámetros de desempeño de un método y lo que estos demuestran en este caso es la confirmación de la identidad y la selectividad/ especificidad. Los métodos analíticos consisten de una etapa de medición la cual puede o no ser producida por una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al mensurando, se debe únicamente al mensurando y no a la presencia de algo química o físicamente similar a lo que surja como una coincidencia.

Para mediciones cualitativas hay posiblemente un umbral de concentración por debajo del cual la especificidad se vuelve poco confiable. El umbral puede variar si el experimento se repite en otro tiempo con diferentes reactivos, fortificaciones, materiales adicionados. [31]

Una vez que la herramienta o el método en nuestro caso son ajustados satisfactoriamente entonces los requisitos de la función y por lo tanto, el método queda validado para la función prevista. El resultado de una validación es una declaración sobre el cumplimiento o incumplimiento de los requisitos para el uso o aplicación dada, sustentada en evidencias, necesariamente objetivas [32].

La validación debe estar sustentada en evidencias que demuestren que nuestro método es apto para el fin que se requiere, para ello hacemos uso de la estadística ya que es una excelente base para comprender muchos fenómenos reales y para orientar la resolución de problemas relativos a estos apoyándonos con estadísticos de prueba o bien pruebas estadísticas. Retomando un poco lo que es la estadística una definición: *"es un campo del estudio relacionado con la recopilación, organización y resumen de datos y la obtención de inferencias acerca de un conjunto de datos cuando sólo se observa una parte de ellos"* [33].

El método estadístico es un conjunto de procedimientos que se emplean para describir y determinar las características de las series de datos, relativas a los fenómenos reales.

El método estadístico se lleva a cabo en las siguientes etapas:

- Recopilación de datos.
- Organización de los datos.
- Análisis de las series de datos.
- Presentación de resultados.
- Formulación de conclusiones.

Para efectuar los análisis se emplean parámetros o medidas estadísticas, que podemos definir como expresiones formuladas que pueden valorar algunas características, del estudio en el que se aplica. Con el propósito de conocer los límites de los valores, la homogeneidad entre ellos, estructura, variación,

compararlos con otros valores, establecer la probabilidad de los valores e inferir las características de una población.

Para ello la evaluación de métodos cualitativos se lleva a cabo mediante estadísticos de prueba, destacan 4: las tablas de contingencia, teorema de Bayes, test estadísticos de Hipótesis y curvas de características de desempeño. El método estadístico definido y una regla de decisión con una confianza estadística le dan solidez a los resultados obtenidos.

Una vez que nuestros datos hayan sido organizados se analizaran con el estadístico de prueba que mejor se adapte a la naturaleza de nuestros datos, no necesariamente se debe aplicar uno solo pueden ser varios, en nuestro estudio utilizamos las tablas de contingencia que se adaptó mejor a la naturaleza de nuestros datos con este estadístico de prueba se realiza un relación de dependencia o independencia entre las variables cualitativas nominales, se calculan 4 parámetros básicos: especificidad, selectividad, falsos positivos y falsos negativos; para identificar relaciones de dependencia entre variables cualitativas se utiliza el estadístico como contraste para afirmar con un nivel de confianza estadístico determinado si los niveles de una variable cualitativa influyen en los niveles de la otra variable nominal analizada. Ver el *Anexo B*.

2.-MARCO HISTORICO

DETERMINACIÓN DE FLUIDO SEMINAL Y SUS COMPONENTES A LO LARGO DE LA HISTORIA; ASPECTO BIOÉTICO EN EL CAMPO DE PRUEBAS FORENSES

El francés Albert Florence, descubrió una de las primeras técnicas para reconocer huellas del líquido seminal; se basaba que al tratar la muestra de este espécimen con una solución concentrada de iodo alcalino, se producían cristales rómbicos de color rojo parduzco, formados por la colina libre.

Al ser descubiertos los rayos ultravioleta por Kirchhoff y Bunsen (1859), se observó que las manchas de semen adquirían bajo esa radiación una fluorescencia azulada. Barberio, médico italiano, trató las manchas seminales con

solución de ácido pícrico y obtuvo cristales amarillos de picrato de espermina. Kutscher y Wolberg en 1935, ponen de manifiesto la alta concentración de fosfatasa ácida en la próstata. [4]

Fishman y Lerner en 1953 dan a conocer su método para estimar fosfatasa ácida de origen prostático. El alemán S. Berg en 1954 describe el empleo de alfa naftol, que a su vez reacciona con dianzil tetrasonio formando un colorante azoico violeta. Kind, reporta una técnica para determinar fosfatasa ácida seminal en 1964 en la revista Forensic Science. [34]

Los trabajos de Weil y Cols de 1956-1962 demuestran la presencia en los espermatozoides de un antígeno denominado “antígeno de revestimiento”. [11]

G.M. Willot en 1972, incluye en la misma revista un procedimiento por el cual el ácido L-tartárico inhibe la fosfatasa seminal y vaginal. En el año de 1978, Sensabaugh aísla una proteína específica del semen humano: la proteína p-30 y en 1983, describe el procedimiento para su determinación por inmunoensayo. [4]

Con anterioridad se han llevado a cabo validaciones de métodos con los mismos fundamentos que las técnicas espermatólogicas empleadas una de estas validaciones, la Validación del método de detección de antígeno prostático específico (PSA), por inmunocromatografía (Orgenics) aplicado a líquido seminal presente en manchas secas y escobillones. Se llevo a cabo en Bogotá Colombia en el Instituto Nacional de Medicina Legal, Ciencias Forenses y Laboratorio de Biología Forense; este estudio permitió validar el test de inmunocromatografía RapidSignal PSA Serum (Orgenics) para la detección de antígeno prostático específico (PSA) en muestras forenses (manchas secas y escobillones) en el laboratorio de Biología Forense del Instituto Nacional de Medicina Legal –Regional Bogotá.

Se estableció que el método desarrollado para la aplicación de la técnica de inmunocromatografía RapidSignal PSA Serum “Orgenics” tiene la capacidad para detectar PSA en semen y tiene un límite de detección de 10 ng/mL. Algunos de los fluidos analizados (saliva, materia fecal, fluidos vaginales, orina femenina, sangre femenina y leche materna) no presentaron interferencia en la detección de la

proteína. Se presentaron resultados positivos para la detección de la proteína en el análisis de orina y sangre de un individuo con cáncer de próstata. A través de este trabajo reportaron una sensibilidad de 91.6% y una especificidad de 100%. El valor predictivo positivo reportado es de 1.00, el valor predictivo negativo es de 0.88. Se encontró evidencia estadística de una relación dependiente entre el resultado de la prueba y la presencia de semen en la muestra. Existe una buena concordancia entre observadores ante la interpretación de los resultados del test. [35]

Habiendo también tesis elaboradas sobre este tema como la realizada por Elena Delgado Peña y Victoria Ballén Torres en la Pontificia Universidad Javeriana en la Facultad de Ciencias de Bogotá en el 2006, en la que se realizó la validación de una técnica inmunocromatográfica para la detección de sangre humana en manchas de interés forense en el laboratorio de biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses en Bogotá aquí el método sobre el cual se realizó la validación empleando el kit Radipsignal Occult Blood- Cassette, de la firma Orgenics. [36]

En esta tesis se validó el método inmunocromatográfico en sangre teniendo una gran similitud con la fosfatasa ácida seminal que se determina también por este método.

Nuestro campo de trabajo involucra el trato con la gente ya sea de manera directa o indirecta; las condiciones y circunstancias por las que nos involucramos con la víctima, o victimarios nos llevan a repasar lo que implica la filosofía moral o la ética, como referente de ese saber de sentido de lo que hacemos y de lo que somos. A la vez que se reclama como aplicar los criterios para saber cómo actuar, es consciente de todo lo que ha estado pasando desde hace más de 2 mil años es puesto en cuestión dadas las nuevas situaciones que se generan con forme evoluciona el desarrollo tecnológico e intelectual del hombre.

El recto ejercicio profesional no consiste sólo en la aplicación técnica de procedimientos diagnósticos o terapéuticos; o en el arte interpretativo de las pruebas realizadas, también es indispensable asumir un compromiso moral con la persona individual y con la sociedad.

Los medios técnicos de que se dispone y los costes para sufragar las necesidades y expectativas de los pacientes y usuarios; las respuestas ante situaciones concretas de discriminación, fragilidad o vulnerabilidad de las personas, o la verdadera misión de los profesionales sanitarios en sus respectivos contextos.

Las relaciones intersubjetivas generan tensiones y no siempre satisfacciones, que no tienen respuestas de certeza para toda condición clínica o de análisis clínico que las instituciones y organizaciones sanitarias a veces no se rigen por criterios de equidad y eficiencia y que con mucha frecuencia, los conflictos morales que surgen en la atención sanitaria no se analizan con el sosiego debido ni se resuelven con la prudencia necesaria.

La ética es algo subjetivo y no se puede enseñar ni obligar; ya que las personas se guían según sus principios y convicciones; sus acciones son buenas o malas sólo según las consecuencias que deriven de ellas.

La Bioética nos ayuda a tomar decisiones prudentes y a realizar valores, se trata de elegir el curso de acción más óptima sin llegar a los extremos. A su vez debe ser un modelo para buscar la calidad, la excelencia en nuestro trabajo; ello puede ayudar a resolver conflictos, conciliar posturas enfrentadas y, reeducar en los nuevos valores surgidos en el ámbito que nos desenvolvemos. [37]

El término “Bio-ética” fue cuñado por Potter (1970). Plasmando sus principios: respeto por las personas, beneficencia, equidad. Poco después Beauchamp y Childress proponían que los valores que entran en general en bioética, giraban en torno a 4 principios: no maleficencia, autonomía, justicia y beneficencia.[38]

- Principio de no maleficencia: no se debe hacer o promover un daño o perjuicio deliberadamente a otro, por acción u omisión, esto incluye también la adecuación riesgo/beneficio.
- Principio de autonomía: se debe respetar las preferencias de las personas capaces y se debe promover activamente la expresión de dichas preferencias; esto ayuda a ver la capacidad de tomar decisiones y gestionar aspectos de la propia vida.
- Principio de justicia: se debe repartir de forma equitativa, las cargas y los beneficios. Solo se justifican diferencias cuando son en beneficio de todos.
- Principio de beneficencia: se debe hacer o promover el bien hacia las personas respetando los ideales de vida buena de cada una de ellas, no podemos hacerle el bien o mal a las personas en contra de su voluntad.

Ninguno de los principios tiene carácter absoluto, por lo que se pueden admitir excepciones que siempre han de plantearse como un mal menor, esto es, cuando a la luz de las consecuencias que se deriven de la aplicación o no de determinado principio en circunstancias particulares, se entienda que se respeta más el canon cuando no se sigue el principio que siguiéndolo, pero con la obligación de justificar racionalmente la decisión, teniendo la carga de la prueba que la tendrá quien plantee la excepción.

Los nuevos roles que se deben cultivar en los bioéticos:

Articuladores de las diversas perspectivas de los participantes en el debate del caso, permitiendo que sus voces y preocupaciones emerjan, se escuchen y se valoren.

Facilitadores del diálogo entre todas las partes interesadas, fomentando el entendimiento mutuo y el respeto.

Referentes (por sus conocimientos y experiencias) en aquellos contextos y puntos de vista que sean especialmente confusos o sistemáticamente motivo de controversia. [37]

Nuestra educación en la Bioética como un empeño compartido nos impulsa para mejorar la calidad de nuestro deber profesional, como personas responsables de una sociedad con variadas creencias que debiera caminar hacia el logro de la excelencia en el aspecto ético de lo cotidiano.

3.- MARCO JUDICIAL

LEYES, CÓDIGOS Y NORMAS QUE SE APLICAN PARA IDENTIFICACIÓN FORENSE DE FLUIDO SEMINAL Y GARANTIZAR LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA ELLO

La realización de las técnicas de espermatología forense tienen su importancia para la demostración científica de la realización del delito y determinación de las sanciones dentro de lo penal basándose en lo que dictan las leyes en el Código Penal, Código Procesal Penal del Estado y la Ley Orgánica de la PGJE. Así mismo la importancia de los derechos y obligaciones de los individuos plasmados en la ley general de salud; como el importante manejo de las muestras obtenidas durante la investigación y sus destino final por la naturaleza a la que pertenecen, esto establecido en la Norma Mexicana 087 que habla del manejo de los Residuos Biológico-Infecciosos. [39]

La Ley General de Salud, que establece ciertos artículos de nuestro interés que nos ayudan a nuestro desenvolvimiento en nuestro campo de investigación:

Artículo 2o.- El derecho a la protección de la salud, tiene las siguientes finalidades:

El bienestar físico y mental del hombre, para contribuir al ejercicio pleno de sus capacidades

V. El disfrute de servicios de salud y de asistencia social que satisfagan eficaz y oportunamente las necesidades de la población;

VI. El conocimiento para el adecuado aprovechamiento y utilización de los servicios de salud, y

VII. El desarrollo de la enseñanza y la investigación científica y tecnológica para la salud.

Artículo 30.- En los términos de esta Ley, es materia de salubridad general:

XVII Bis. El Programa Nacional de Prevención, Atención y Control del VIH/SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual;

XXVIII. El control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y sus componentes y células;

XXVIII Bis. El control sanitario de cadáveres de seres humanos;

En el **TITULO TERCERO; Prestación de los Servicios de Salud; CAPÍTULO I Disposiciones Comunes**

Artículo 25.- Conforme a las prioridades del Sistema Nacional de Salud, se garantizará la extensión cuantitativa y cualitativa de los servicios de salud, preferentemente a los grupos vulnerables.

Artículo 27. Para los efectos del derecho a la protección de la salud, se consideran servicios básicos de salud los referentes a:

II. La prevención y el control de las enfermedades transmisibles de atención prioritaria, de las no transmisibles más frecuentes y de los accidentes;

X. La asistencia social a los grupos más vulnerables y, de éstos, de manera especial, a los pertenecientes a las comunidades indígenas

En estos artículos sobresale uno de los aspectos más importantes para llevar a cabo nuestra investigación, ya que las muestras son tomadas de personas que se sospecha pudieron ser víctimas de un abuso sexual, lo cual las vuelve vulnerables física y mentalmente, como comentamos antes la bioética entra aspecto para brindarles un servicio y atención profesional y moralmente.

En el **CAPÍTULO IV; Usuarios de los Servicios de Salud y Participación de la Comunidad;** se destacan 3 artículos que complementan lo anterior.

Artículo 51.- Los usuarios tendrán derecho a obtener prestaciones de salud oportunas y de calidad idónea y a recibir atención profesional y éticamente responsable, así como un trato respetuoso y digno de los profesionales, técnicos y auxiliares

Artículo 55.- Las personas o instituciones públicas o privadas que tengan conocimiento de accidentes o que alguna persona requiera de la prestación urgente de servicios de salud, cuidarán, por los medios a su alcance, que los mismos sean trasladados a los establecimientos de salud más cercanos, en los que puedan recibir atención inmediata, sin perjuicio de su posterior remisión a otras instituciones.

Artículo 56.- De conformidad con lo que señalen las disposiciones generales aplicables, los agentes del Ministerio Público que reciban informes o denuncias sobre personas que requieran de servicios de salud de urgencia, deberán disponer que las mismas sean trasladadas de inmediato al establecimiento de salud más cercano.

Un punto que no nos corresponde directamente a nosotros en nuestro desenvolvimiento de nuestra investigación directamente pero que si tiene conexión se expresa en el **CAPÍTULO VII; Salud Mental**, ya que después de un agravio sexual o intento de este tipo de agresiones la persona puede quedar afectada psicológicamente, teniendo que recibir atención especializada, y nosotros como profesionales debemos llevar a cabo nuestro deber, de manera muy sutil destacando nuevamente nuestra ética profesional.

En el **TITULO CUARTO; Recursos Humanos para los Servicios de Salud; CAPÍTULO I; Profesionales, Técnicos y Auxiliares**

Artículo 79.- Para el ejercicio de actividades profesionales en el campo de la medicina, odontología, veterinaria, biología, bacteriología, enfermería, trabajo social, química, psicología, ingeniería sanitaria, nutrición, dietología, patología y sus ramas, y las demás que establezcan otras disposiciones legales aplicables, se requiere que los títulos profesionales o certificados de especialización hayan sido legalmente expedidos y registrados por las autoridades educativas competentes.

CAPÍTULO V; Salud Ocupacional

Artículo 130.- La Secretaría de Salud, en coordinación con las autoridades laborales y las instituciones públicas de seguridad social, y los gobiernos de las

entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia, promoverán desarrollarán y difundirán investigación multidisciplinaria que permita prevenir y controlar las enfermedades y accidentes ocupacionales, y estudios para adecuar los instrumentos y equipos de trabajo a las características del hombre.

Este capítulo se complementa con el siguiente: **TITULO OCTAVO; Prevención y Control de Enfermedades y Accidentes; CAPÍTULO II; Enfermedades Transmisibles y con la Norma Mexicana 087 que se abordara más adelante**

Artículo 137.- Las personas que ejerzan la medicina o que realicen actividades afines, están obligadas a dar aviso a las autoridades sanitarias de los casos de enfermedades transmisibles; posteriormente a su diagnóstico o sospecha diagnóstica.

Artículo 138.- Están obligados a dar aviso, en los términos del Artículo 136 de esta Ley, los jefes o encargados de laboratorios, los directores de unidades médicas, escuelas, fábricas, talleres, asilos, los jefes de oficinas, establecimientos comerciales o de cualquier otra índole y, en general, toda persona que por circunstancias ordinarias o accidentales tenga conocimiento de alguno de los casos de enfermedades a que se refiere esta Ley.

Artículo 142.- Los profesionales, técnicos y auxiliares de la salud, al tener conocimiento de un caso de enfermedad transmisible, están obligados a tomar las medidas necesarias, de acuerdo con la naturaleza y características del padecimiento, aplicando los recursos a su alcance para proteger la salud individual y colectiva.

Artículo 146.- Los laboratorios que manejen agentes patógenos estarán sujetos a control por parte de las autoridades sanitarias competentes, de conformidad con las normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Salud, en lo relativo a las precauciones higiénicas que deban observar, para evitar la propagación de las enfermedades transmisibles al hombre.

CAPÍTULO IV; Accidentes

Artículo 162.- Para los efectos de esta Ley, se entiende por accidente el hecho súbito que ocasione daños a la salud, y que se produzca por la concurrencia de condiciones potencialmente prevenibles.

Artículo 163.- La acción en materia de prevención y control de accidentes.

Resumiendo los capítulos anteriores en materia de accidentes, en nuestro ambiente de trabajo manejamos instrumental y equipo que tiene contacto directo o indirectamente con la víctima, de modo que al estar realizando la toma de muestra o la técnica para la determinación que se busca, tenemos contacto directo con la muestra biológica, como nosotros no somos un laboratorio de diagnóstico clínico médico, todas las muestras son consideradas potencialmente contagiosas por que desconocemos la salud de la víctima o presunto agresor; es aquí donde entra la organización del laboratorio, las medidas de seguridad y prevención de accidentes.

En el **TÍTULO NOVENO; Asistencia Social, Prevención de Invalidez y Rehabilitación de Inválidos; CAPÍTULO UNICO**

Artículo 167.- Para los efectos de esta Ley, se entiende por Asistencia Social el conjunto de acciones tendientes a modificar y mejorar las circunstancias de carácter social que impidan al individuo su desarrollo integral, así como la protección física, mental y social de personas en estado de necesidad, desprotección o desventaja física y mental, hasta lograr su incorporación a una vida plena y productiva.

Artículo 168.- Son actividades básicas de Asistencia Social:

- IV.** El ejercicio de la tutela de los menores, en los términos de las disposiciones legales aplicables;
- V.** La prestación de servicios de asistencia jurídica y de orientación social, especialmente a menores, ancianos e inválidos sin recursos;
- VI.** La realización de investigaciones sobre las causas y efectos de los problemas prioritarios de asistencia social;

Artículo 171.- Los integrantes del Sistema Nacional de Salud, deberán dar atención preferente e inmediata a menores y ancianos sometidos a cualquier forma de maltrato que ponga en peligro su salud física y mental. Asimismo, darán esa atención a quienes hayan sido sujetos pasivos de la comisión de delitos que atenten contra la integridad física o mental o el normal desarrollo psico-somático de los individuos.

En estos casos, las instituciones de salud podrán tomar las medidas inmediatas que sean necesarias para la protección de la salud de los menores y ancianos, sin perjuicio de dar intervención a las autoridades competentes.

CAPÍTULO VIII; Equipos médicos, prótesis, ortesis, ayudas funcionales, agentes de diagnóstico, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos, de curación y productos higiénicos

Artículo 262.- Para los efectos de esta Ley, se entiende por:

III. Agentes de diagnóstico: Todos los insumos incluyendo antígenos, anticuerpos, calibradores, verificadores, reactivos, equipos de reactivos, medios de cultivo y de contraste y cualquier otro similar que pueda utilizarse como auxiliar de otros procedimientos clínicos o paraclínicos.

Productos higiénicos: Los materiales y sustancias que se apliquen en la superficie de la piel o cavidades corporales y que tengan acción farmacológica o preventiva.

Artículo 264. El proceso, uso y mantenimiento de equipos médicos y agentes de diagnóstico en los que intervengan fuentes de radiación, se ajustarán a las normas oficiales mexicanas o disposiciones aplicables, incluso en la eliminación de desechos de tales materiales, sin perjuicio de la intervención que corresponda a otras autoridades competentes.

Artículo 265.- Las etiquetas y contra etiquetas de los agentes de diagnóstico que se empleen en dispositivos o equipos médicos, además de los requisitos establecidos en el Artículo 210 de esta Ley, deberán contener la leyenda "Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinetes.

Las indicaciones sobre el uso que tengan dentro del laboratorio o gabinete, la técnica para su empleo, su forma de aplicación, en su caso, y precauciones de uso, se detallarán en un instructivo adjunto al producto. [40]

Una vez manejado en materia de salud los derechos de la víctima y las obligaciones de nosotros mismo, abordaremos en ámbito penal comenzaremos con El **CÓDIGO PENAL DEL ESTADO DE MICHOACÁN (Última Reforma publicada en el Periódico Oficial del Estado El 17 de Octubre de 2007)**.

Se establece por ley las sanciones que se imponen en el estado de Michoacán siendo de nuestro interés los delitos que induzca, lleven a la parcial o completa realización de un agravante sexual.

Donde se hace referencia en el título decimocuarto: Delitos Contra la libertad y seguridad sexual, en los capítulos:

- I. **Violación:** a quien por medio de la violencia física o moral, tenga cópula con una persona cualquiera que sea su sexo **artículos 240-242**
- II. **Estupro:** Al que tenga cópula con persona, menor de dieciséis años y mayor de doce años, obteniendo su consentimiento por medio de la seducción o engaño **artículos 243-244**
- III. **Abusos deshonestos:** vigente, al que sin consentimiento de una persona ejecute o haga ejecutar un acto sexual, sin el propósito de llegar a la copula **artículos 245-246**
- IV. **Acoso sexual:** Al que mediante coacción física, psicológica o verbal, solicite a otra persona de manera reiterada para sí o para un tercero, cualquier tipo de actos de naturaleza sexual **artículo 246 bis**. [41]

Basándonos en el código penal una vez determinado el delito o la falta cometida se somete a la presentación y desahogo de pruebas para la comprobación de que hubo o no delito, es entonces donde entra la ciencia forense y el peritaje para determinar y comprobar científicamente que hubo o no el agravio, pero apegándonos a la ley nos apegamos al Código de Procedimientos Penales del

Estado de Michoacán y a la Ley Orgánica de la PGJE; abordaremos **el Código de Procedimientos Penales del Estado de Michoacán** como se establece en:

LIBRO PRIMERO: DISPOSICIONES GENERALES, **TITULO PRIMERO** PROCESO, ACCION Y EXCEPCION **CAPÍTULO I** OBJETO Y FINALIDAD DEL PROCESO PENAL

ARTÍCULO 1º.- Objeto del proceso penal.- El objeto del proceso penal es la pretensión punitiva derivada de un acto previsto por la ley como delito, y toda otra cuestión de la que deba conocer el órgano jurisdiccional, relacionada con la misma pretensión que el Ministerio Público debe hacer valer por medio de la acción penal.

ARTÍCULO 2º.- Finalidad del proceso penal.- La finalidad del proceso penal es obtener, mediante la sentencia del órgano jurisdiccional, la declaración de certeza respecto a la existencia del acto delictivo que sirve de fundamento a la pretensión punitiva del Estado, y la aplicación de sus consecuencias jurídicas.

TITULO SEGUNDO AVERIGUACIÓN PREVIA CAPÍTULO I, INICIACIÓN DE LA INDAGATORIA

ARTÍCULO 14.- Inicio de la averiguación previa.- El Ministerio Público y sus auxiliares, de acuerdo con las órdenes que reciban de aquél, están obligados a proceder de oficio a la investigación de los delitos de que tengan noticia. La averiguación previa no podrá iniciarse de oficio en los casos siguientes:

I.- Cuando se trate de delitos en los que solamente se pueda proceder por querrela necesaria, si ésta no se ha presentado; y,

II.- Cuando la ley exija algún requisito previo, si éste no se ha llenado. Si el que inicia una investigación no tiene a su cargo la función de proseguirla, dará inmediata cuenta al que corresponda legalmente practicarla.

Cuando para la persecución de un delito se requiera querrela u otro acto equivalente a título de requisito de procedibilidad, la Representación Social actuará según lo previsto en la Ley Orgánica de la Procuraduría General de Justicia del Estado, para conocer si la autoridad formula querrela o satisface el requisito de procedibilidad equivalente.

En el CAPÍTULO II REGLAS ESPECIALES PARA LA PRÁCTICA DE DILIGENCIAS Y LEVANTAMIENTO DE ACTAS DE AVERIGUACION PREVIA

ARTÍCULO 22.- Reglas para la práctica de diligencias de averiguación previa.- Inmediatamente que el Ministerio Público o los funcionarios encargados de practicar en su auxilio diligencias de averiguación previa, tengan conocimiento de la probable existencia de un delito, dictarán todas las medidas y providencias necesarias para:

I.- Proporcionar seguridad y auxilio a las víctimas;

En casos de extorsión, el Ministerio Público podrá:

a) Intervenir las comunicaciones de las víctima previo su consentimiento; y,

b) Solicitar los informes y registros necesarios para demostrar el hecho.

II.- Impedir que se pierdan, destruyan o alteren las huellas y vestigios del hecho delictuoso, los instrumentos o cosas objeto o productos del mismo;

III.- Saber qué personas fueron testigos;

IV.- Evitar que el delito se siga cometiendo; y,

V.- En general, impedir que se dificulte la averiguación, procediendo a la detención de los que intervinieron en su comisión en los casos de delito flagrante.

VI. Impedir que los órganos de una persona declarada con muerte cerebral, que sean útiles para fines terapéuticos, de investigación o docencia, solicitados por instituciones de salud, pierdan su función fisiológica, para lo cual deberá realizar sin dilación las diligencias que el caso amerite, previo consentimiento escrito del titular o del representante legítimo.

En dichos supuestos el Ministerio Público iniciará desde luego la averiguación previa y bajo su responsabilidad, según procediere, decretará la retención del indiciado si el delito es perseguible de oficio o perseguible previa querrela u otro requisito equivalente que ya se encuentre satisfecho, o bien, ordenará la libertad del detenido.

En los casos de flagrancia y urgencia, ningún indiciado podrá ser retenido por el Ministerio Público por más de cuarenta y ocho horas, plazo en el que deberá

ordenar su libertad o ponerlo a disposición de autoridad judicial. Este plazo podrá duplicarse en los casos de delincuencia organizada.

Si la integración de la averiguación previa requiere mayor tiempo del señalado en el párrafo anterior, el detenido será puesto en libertad sin perjuicio de lo previsto en el artículo 129 de este Código.

La violación de las disposiciones contenidas en este numeral respecto de la privación de la libertad de los indiciados, hará penalmente responsable al agente del Ministerio Público o a sus auxiliares.

En el TITULO QUINTO ACTOS PROCESALES, CAPÍTULO V, COMPROBACION DE LOS ELEMENTOS CONSTITUTIVOS DEL TIPO PENAL

ARTÍCULO 106.- Qué se entiende por comprobación de los elementos constitutivos del tipo penal.- Se tendrán por acreditados los elementos constitutivos del tipo penal, cuando se justifiquen por cualquier medio probatorio que señale la ley o no esté reprobado por ésta.

ARTÍCULO 107.- Quién debe comprobar los elementos constitutivos del tipo penal.- El Ministerio Público y el tribunal deberán procurar la comprobación de los elementos configurativos del tipo penal, base del procedimiento penal.

ARTÍCULO 108.- Lesiones externas.- Los elementos constitutivos del ilícito se tendrán por comprobados, si las lesiones son externas, con la inspección de éstas efectuada por el funcionario que practique la averiguación previa o por el tribunal que conozca del caso, y con la descripción y clasificación que de ellas hagan los peritos médicos.

ARTÍCULO 109.- Lesiones internas.- En caso de lesiones internas, se tendrán por demostrados los elementos configurativos del tipo penal, con la inspección que hagan los funcionarios a quienes se refiere el artículo 108, de las manifestaciones sintomáticas exteriores que se encuentren en la víctima, y con el dictamen pericial en el que, previos estudios auxiliares de diagnóstico que el perito médico considere necesarios, se determinen las lesiones que presente, y que las mismas han sido producidas por una causa externa. En caso de no existir manifestaciones sintomáticas exteriores, bastará con el dictamen pericial.

ARTÍCULO 110.- Homicidio.- Los elementos constitutivos del delito de homicidio se tendrán por comprobados con la inspección y descripción del cadáver, hecha en los términos de los dos artículos anteriores, y con el dictamen de los peritos médicos, quienes practicarán la necropsia y expresarán con minuciosidad el estado que guarde el cadáver y las causas que originaron la muerte. Si hubiere sido sepultado sin autorización legal, se procederá a exhumarlo, para los efectos expresados. Podrá dejar de practicarse la necropsia, cuando, durante la indagatoria, el Ministerio Público, previa opinión de los peritos médicos, y cuando la causa del deceso sea evidente y demostrable en la exploración exterior del cadáver, estime que no es necesaria; en este caso, bastará que los peritos, previa exploración de las lesiones que éste presente, declaren que la muerte fue resultado de las lesiones inferidas. La causa de la muerte debe ser evidente y patente.

Si en el proceso el tribunal considera que es ineludible la necropsia, aún cuando la Representación Social en la averiguación previa hubiera acordado la dispensa de la misma, se ordenará la exhumación del cadáver para que se lleve a efecto.

CAPÍTULO VI, HUELLAS DEL DELITO, ASEGURAMIENTO DE LOS INSTRUMENTOS Y OBJETOS DEL MISMO

ARTÍCULO 117.- Instrumentos y cosas objeto del delito.- Los instrumentos del delito y las cosas objeto o producto de él, así como aquéllos en que existan huellas del mismo o pudieren tener relación con éste, serán asegurados ya sea reconociéndolos, poniéndolos en secuestro judicial o simplemente al cuidado y bajo la responsabilidad de alguna persona, para que no se alteren, destruyan o desaparezcan. Cuando se trate de delitos imprudenciales con motivo del tránsito de vehículos, si los conductores fueren los propietarios, aquéllos deberán asegurarse para los efectos de la reparación del daño; en el caso de que se garantice satisfactoriamente el monto del menoscabo material, se levantará el aseguramiento del vehículo.

Si el propietario es un tercero ajeno, deberá restituirsele en el goce de sus derechos cuando acredite legalmente la propiedad; el ofendido podrá en su

momento, acudir al procedimiento a que se refieren los artículos del 432 al 436 de este Código. La notificación relativa a la subasta de los bienes no reclamados o la aplicación del producto de la venta que no se reclame por el interesado, se llevará a cabo de la manera siguiente:

I.- Personalmente, si el interesado se encontrare presente;

II.- Por instructivo que se deje en su domicilio, con alguno de los moradores o de los trabajadores que ahí asistan; si no se encuentra nadie en el lugar, la cédula se fijará en la puerta de entrada y el motivo se hará constar en autos; o,

III.- Si no se conociere el domicilio o la identidad del interesado, mediante la publicación por dos veces con intervalos de tres días, en el Periódico Oficial del Estado.

De todas las cosas aseguradas se hará un inventario en el que se les describirá de tal manera que en cualquier tiempo puedan ser identificadas.

CAPÍTULO VII, ATENCION MÉDICA A LOS LESIONADOS

ARTÍCULO 126.- Responsiva médica.- La responsiva a que se refiere el artículo 124, impone al médico las obligaciones siguientes:

I.- Atender debidamente al lesionado;

II.- Informar a la autoridad que conozca de la averiguación previa o proceso, de cualquier accidente o complicación que sobrevenga, expresando si es consecuencia inmediata o necesaria de las lesiones o si proviene de otra causa, y proporcionarle los datos que le solicite;

III.- Comunicar inmediatamente a la misma autoridad todo cambio del lugar donde sea atendido el lesionado; y, IV. Extender certificado de sanidad, o de defunción si muere el lesionado, con los datos pertinentes del caso.

El incumplimiento de cualquiera de las obligaciones señaladas en este artículo, se sancionará con la imposición de una corrección disciplinaria en caso de que no sea delictuoso.

LIBRO SEGUNDO, DESARROLLO DEL PROCESO PENAL, TITULO PRIMERO,
DESARROLLO DEL PROCESO ANTE LOS JUECES DE PRIMERA INSTANCIA
CAPÍTULO III, MEDIOS DE PRUEBA, SECCION NOVENA, INDICIOS Y
PRESUNCIONES

ARTÍCULO 323.- Qué son los indicios.- Los indicios son el resultado de la valoración conjunta de los elementos probatorios que obran en el proceso penal; elementos que deben ser esenciales y estar constituidos por hechos y circunstancias conocidos, con un enlace natural con la verdad desconocida que se pretende encontrar, y acreditados con prueba directa; los cuales no deberán apreciarse en forma aislada, habida cuenta que cada medio de prueba constituye un indicio, ya sea anterior, coetáneo o posterior al hecho que dio origen al proceso; y de su relación, concatenación y armonía lógicas y jurídicas, deberá surgir una conclusión que, unívoca e inequívocamente conduzca al juzgador a la verdad legal buscada.

ARTÍCULO 324.- Qué es la presunción.- La presunción es un instrumento judicial, a través del cual se precisa el hecho controvertido por medio de inducciones o deducciones de otros hechos probados, complementando un dato, determinando una incógnita o verificando una hipótesis, tanto respecto de los elementos constitutivos del injusto penal, cuanto sobre la responsabilidad penal del inculcado y las circunstancias del hecho imputado.

SECCION DECIMA, APRECIACION DE LAS PRUEBAS

ARTÍCULO 325.- Valoración de las pruebas.- Los tribunales deberán valorar las pruebas separadamente y examinar su concordancia, tomando en consideración los principios de la sana crítica, y expondrán en sus resoluciones los razonamientos que hayan tenido en cuenta para hacer la valoración. Asimismo, se ajustarán a la apreciación que se hace sobre el valor jurídico de la prueba en esta sección. [42]

Como todo el personal debe de seguir leyes o normas dentro del mismo organismo donde se llevaba a cabo las averiguaciones criminalísticas, para

comprobar si hubo o no el agravio que se investiga estos derechos y obligaciones están expresados en la Ley Orgánica de la Procuraduría General del Estado de Michoacán (*Última reforma publicada en el Periódico Oficial del Estado El 21 de Noviembre de 2007*), en esta ley se manifiesta qué es el organismo llamado Procuraduría General del Estado de Michoacán, como y quién lo conforma, derechos y obligaciones del organismo, los requisitos que debe cumplir una persona que quiera pertenecer a este tipo de organismo, la capacitación y mejora continua que se le debe de dar para que se desenvuelva eficientemente en su trabajo para que sea de calidad, también se establece quienes poseen la facultad de intervenir en las investigaciones judiciales y órganos auxiliares así como en las condiciones en las que se desenvuelve el personal acatándose a las leyes judiciales en nuestro ámbito de estudio destacan los siguientes artículos de esta ley:

CAPÍTULO I ATRIBUCIONES

Artículo 1º.- La Procuraduría General de Justicia del Estado, es la dependencia del Poder Ejecutivo del Estado, en la que se integran la Institución del Ministerio Público y sus órganos auxiliares directos para el despacho de los asuntos que le atribuye la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, la Constitución Política del Estado Libre Soberano de Michoacán de Ocampo, la presente Ley y las demás disposiciones aplicables.

Artículo 2º.- La Institución del Ministerio Público Estatal, es presidida por el Procurador General de Justicia y es Jefe de esta Institución y de sus órganos auxiliares directos.

Artículo 4º.- En los casos en que deba intervenir el Ministerio Público, el Procurador General de Justicia podrá hacerlo por sí o por medio de alguno de sus agentes. La presente ley fijará el número, adscripción y demás deberes y atribuciones de los funcionarios y empleados que integran la Institución.

Artículo 6º.-El Ministerio Público, en su carácter de Representante Social, tendrá las atribuciones siguientes:

I.- Investigar y perseguir los delitos de su competencia;

Artículo 7º.-

En la investigación y persecución de los delitos le corresponde al Ministerio Público el ejercicio de las atribuciones siguientes:

I.- Durante la averiguación previa: incisos

b) Investigar los delitos con el auxilio de los órganos señalados en el artículo 14 de la presente Ley;

c) Practicar diligencias y allegarse pruebas a fin de acreditar los elementos del o los tipos penales y la probable responsabilidad de quien en ellos hayan participado para fundamentar el ejercicio de la acción penal;

d) Ordenar, cuando se den los supuestos del artículo 16 Constitucional, la detención, de los inculcados, fundando y expresando los indicios que motivan su determinación;

f) Restituir de manera provisional al ofendido en el goce de derechos sobre sus bienes, objeto del ilícito, cuando esté comprobado el tipo penal, proceda legalmente y medie petición de parte o se declare de oficio, exigiendo garantía suficiente cuando se considere necesario;

g) En el ámbito de su competencia y de acuerdo a lo dispuesto en el último párrafo del artículo 95 de la Constitución Política del Estado, proporcionar auxilio y seguridad a las víctimas, así como tomar las providencias necesarias y dictar las medidas precautorias o de aseguramiento, que resulten indispensables para los fines de la averiguación previa;

h) Conceder la libertad bajo caución a los indiciados, cuando legalmente proceda;

III.- En su intervención como parte en el proceso: incisos

a) Intervenir en todas las diligencias que se efectúen durante el procedimiento judicial y promover dentro del mismo, aquellas que conduzcan al debido esclarecimiento de los hechos, a la comprobación de los elementos del tipo penal y a la plena responsabilidad del procesado

e) Promover en segunda instancia las impugnaciones que la ley prevea, ofrecer las pruebas pertinentes, intervenir en el desahogo de las que se reciban y expresar agravios en tiempo y forma.

Artículo 8°.- La vigilancia de la legalidad y de la pronta y expedita procuración e impartición de justicia,

Comprende: apartado

III. Implementar las medidas necesarias para el mejoramiento de la procuración e impartición de justicia en la Entidad y el desarrollo de estudios en materia de criminología.

CAPÍTULO II BASES DE ORGANIZACIÓN

Artículo 14.- Son auxiliares del Ministerio Público, obligados a cumplir con sus órdenes:

I. La Policía Ministerial Investigadora;

II.- Los peritos de la Institución;

III.- El Director de Seguridad Pública y Tránsito del Estado y los elementos a su cargo;

IV.- Los síndicos, jefes de tenencia y encargados del orden en los municipios de la Entidad; y, Las policías Estatal Preventiva y Municipal

Artículo 18.- Para ingresar al servicio de la Procuraduría como Agente del Ministerio Público, Agente de la Policía Ministerial Investigadora o Perito, los interesados deberán participar en los concursos de oposición a que se convoque, conforme al Reglamento de esta Ley. Excepcionalmente cuando se trate de personas de reconocido prestigio y experiencia profesional, y por acuerdo del Procurador, podrá dispensarse el cumplimiento del requisito.

Quienes ingresen al servicio de la Procuraduría, estarán obligados a participar en los cursos que se organicen, en los que se les capacitará y actualizará en la función de representación social que corresponde a la institución, y sobre las materias especiales que de acuerdo con la función corresponda en cada caso; todo ello, conforme a los programas que al efecto se aprueben, de conformidad con el Reglamento de esta Ley.

CAPÍTULO III DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 25.- En el ejercicio de sus funciones, el personal de la Procuraduría observará las obligaciones inherentes a su calidad de servidores públicos, de acuerdo con sus atribuciones específicas, y actuará con la diligencia necesaria para una pronta y eficaz procuración y administración de justicia.

Artículo 30.- El personal técnico de Servicios Periciales no podrá aceptar el cargo de perito en ningún asunto ajeno de la Institución, o en otra instancia, únicamente como tercero en discordia en los casos que determine la Ley. [43]

La Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 establece los requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, donde también se incluye el muestreo, esto aplicado a los métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el mismo laboratorio. Se establece requisitos relativos a la gestión como lo son la organización del laboratorio; tanto de sus actividades de prueba como los requisitos de calibración, el control de documentos, revisión de pedidos, ofertas y contratos, subcontratación de ensayos y calibraciones, servicio al cliente, etc. El laboratorio debe estar en una mejora continua para mejorar su sistema de gestión esto mediante el uso de manuales de calidad, política de calidad con auditorías para el análisis de resultados, acciones preventivas y correctivas. Debe realizar las pruebas que satisfacen las necesidades del cliente que sean apropiadas a las técnicas que realiza el mismo, pero que de preferencia sean técnicas o métodos establecidos en normas ya sea nacionales o internacionales ; es por ello que el laboratorio debe confirmar que puede aplicar los métodos antes de utilizarlos ya sean normalizados, no normalizados o desarrollados, dicho método debe haber sido validado antes de su uso para así considerarlo capaz de cubrir con las especificaciones establecidas en la norma.

Cabe señalar que no todos los puntos establecidos en dicha norma se aplican a nuestro estudio, y en la misma norma lo señala solo los puntos que abarque nuestro campo de aplicación, centrándonos el punto 5.4 Métodos de ensayo y

calibración y validación de los métodos donde se establece la manera en la que se aplican los procedimientos para todos los ensayos, desde el muestreo, el transporte, almacenamiento y la manipulación o procesamiento de la muestra con el método o técnica correspondiente para ser tratada, es necesario se cuente con las instrucciones y procedimientos para llevar a cabo cada parte para garantizar que el procedimiento es correcto y no se comprometan los resultados de las técnicas o ensayos realizados. Ya que en el laboratorio las muestras se reciben, y no son tomadas directamente por el laboratorio no aplican los procedimientos de toma de la muestra y transporte, pero no está por demás saberlo.

“La gama y la exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados (por ejemplo la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o reproducibilidad, la robustez ante influencias externas a la sensibilidad cruzada frente a las inferencias provenientes de la matriz de la muestra o del ensayo tal como fueron fijadas para el uso de los clientes”.

“La validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una verificación de los requisitos pueden satisfacerse utilizando el método, y una declaración sobre la validez”. [24]

La Norma Mexicana NMX-EC-15189-IMNC-2008 establece los requisitos particulares que deben cumplir los laboratorios clínicos para la calidad y competencia, se aplica para evaluar la calidad del laboratorio y evaluar su competencia frente a otros, esta norma es utilizada por los organismos de acreditación para confirmar o reconocer que los laboratorios cumplen con la competencia.

Dicha norma describe los pasos que tenemos que seguir para dicho fin, las definiciones de los términos que en ella se expresan, y mencionando paso a paso los criterios con los cuales debe de cumplir el laboratorio para obtener el reconocimiento; esto es desde el control de documentos, la revisión de contratos, servicios externos y auditorías, registros de calidad y técnicos, personal, instalaciones, equipo de laboratorio etc. Nuestro interés se centra en los

procedimientos de examen en esta parte se debe asegurar la protección de la información confidencial, como se expreso anteriormente la bioética juega un papel muy importante ya que se tiene que evitar involucrarse en cualquier actividad que pudiera disminuir la confianza en cuanto al juicio e integridad de los resultados o durante el procedimiento completo; es decir ser imparcial.

En cuanto al sistema de gestión de calidad, se deben de contar con manuales de calidad, programas y procedimientos que el mismo laboratorio y el personal que el labora deben seguir al pie de la letra para no poner en riesgo la calidad e integridad del sistema de gestión, ahora bien el personal debe ser gente capacitada y supervisada continuamente, debe ser supervisado apropiada a su experiencia laboral y nivel de responsabilidad que ejerce dentro del laboratorio; ya que se tiene el compromiso con una buena práctica profesional, la calidad de las pruebas que se realizan y el cumplimiento con el sistema de gestión de calidad.

Se establecen los requisitos de las instalaciones del laboratorio las cuales deben ser acorde a las prácticas desarrolladas en el mismo, que no afecten o alteren la calidad de los instrumentos, reactivos, equipo y muestras utilizadas; para ello debe existir procedimientos escritos por el laboratorio donde se exprese el modo correcto de cada uno de los equipos o instrumentos, así como la fecha o el periodo para verificarlos, calibrarlos o darles el mantenimiento adecuado para seguir garantizando la integridad de los resultados, los reactivos deben ser supervisados en cuanto a fecha de caducidad o el correcto almacenamiento para evitar la degradación del reactivo y pueda afectar en los resultados de la prueba.

Una parte importante en esta norma y que principalmente nos interesa en la aplicación de nuestro estudio llevado a cabo es el apartado 5.5 Procedimientos de examen el cual establece que “El laboratorio solo debe de utilizar únicamente procedimientos validados para confirmar que los procedimientos de examen son apropiados para el uso al que esta destinado. Las validaciones deben ser tan extensas como sea necesario para cumplir las necesidades de la aplicación dado...” [25], de aquí el propósito de nuestro estudio la validación para demostrar

con la evidencia que nuestros métodos o técnicas si cumplen con las necesidades para las cuales se tienen destinadas, sin sacrificar la calidad del método y por lo tanto de los resultados mismo.

Este capítulo se complementa con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que establece el manejo y control de los Residuos Biológico Infecciosos comentada mas adelante.

Considerando que el líquido seminal es un residuo biológico este puede ser infeccioso y tiene que ser tratado de una manera especial, según lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, *Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos de ahí la relevancia en nuestro estudio.[39]

Se establece que en la clasificación de residuos biológicos infecciosos en el apartado 4, las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento. El líquido seminal entra en este apartado ya que es sobre este tipo de muestra sobre el cual nosotros efectuamos las pruebas para la determinación de espermatozoides; así mismo entran como residuos no anatómicos las prendas o materiales de donde extrajimos nuestra muestra como las prendas íntimas, toallas sanitarias, papel sanitario, preservativo, los objetos punzocortantes en dado caso de haberlos utilizado como parte de nuestra investigación que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá ser separado y envasado según corresponda el tipo de residuo peligroso biológico-infeccioso, de acuerdo con sus características físicas y

biológicas infecciosas antes de ser dispuesto al prestador de servicios encargado de la recolección , transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Como establece la norma la clasificación de los establecimientos generadores de residuos biológicos infecciosos, el laboratorio se encuentra en el nivel I ya que no genera más de 25 Kg de residuos por mes. Por ello esta permitido contratar a los servicios de un prestador de servicios común, quien será el responsable del manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Los establecimientos generadores se clasifican como se establece en la tabla 1.

TABLA 1 Clasificación de los establecimientos generadores para el manejo de RPBI

NIVEL I	NIVEL II	NIVEL III
Unidades hospitalarias de 1 a 5 camas e instituciones de investigación con excepción de los señalados en el Nivel III. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 1 a 50 muestras al día. Unidades hospitalarias psiquiátricas. Centros de toma de muestras para análisis clínicos.	Unidades hospitalarias de 6 hasta 60 camas; Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 51 a 200 muestras al día; Bioterios que se dediquen a la investigación con agentes biológico-infecciosos, o Establecimientos que generen de 25 a 100 kilogramos al mes de RPBI.	Unidades hospitalarias de más de 60 camas; Centros de producción e investigación experimental en enfermedades infecciosas; Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis a más de 200 muestras al día, o Establecimientos que generen más de 100 kilogramos al mes de RPBI.

Se lleva una serie de pasos para el manejo de los residuos biológico infecciosos por fases de manejo establecidos en el apartado 6 de esta norma:

6.2 Identificación y envasado según el tipo de residuo y estado físico como lo indica la tabla 2:

TABLA 2 Clasificación de tipos de RPBI para su separación y envasado

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

a) Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos.

Las bolsas se llenarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.

Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique “RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLOGICO-INFECIOSOS” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico

Almacenamiento

Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Los establecimientos generadores incluidos en el Nivel I de la tabla 1 de esta Norma Oficial Mexicana, quedan exentos del cumplimiento del punto 6.3.5 y podrán ubicar los contenedores a que se refiere el punto 6.3.2 en el lugar más apropiado dentro de sus instalaciones, de manera tal que no obstruyan las vías de acceso.

El punto 6.3.2 establece: Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda “RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO-INFECIOSOS”.

El punto 6.3.3 establece el periodo de almacenamiento temporal estará sujeto al tipo de establecimiento generador para Nivel I es de máximo 30 días.

Como se establece en el punto 6.3.4: “los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C, en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo”.

El punto 6.3.5 establece que el área de almacenamiento temporal de residuos peligrosos biológico-infecciosos debe:

- a)** Estar separada de las áreas de personas, materiales de laboratorio, cocinas, comedores, instalaciones sanitarias, sitios de reunión, áreas de esparcimiento, oficinas, talleres y lavanderías.
- b)** Estar techada, ser de fácil acceso, para la recolección y transporte, sin riesgos de inundación e ingreso de animales.
- c)** Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los mismos, en lugares y formas visibles, el acceso a esta área sólo se permitirá al personal responsable de estas actividades.
- d)** El diseño, construcción y ubicación de las áreas de almacenamiento temporal destinadas al manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos en las empresas prestadoras de servicios, deberán ajustarse a las disposiciones señaladas y contar con la autorización correspondiente por parte de la SEMARNAT.
- e)** Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos que no cuenten con espacios disponibles para construir un almacenamiento temporal, podrán utilizar contenedores plásticos o metálicos para tal fin, siempre y cuando cumplan con los requisitos mencionados en los incisos a), b) y c) de este numeral.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos podrán ser almacenados en centros de acopio, previamente autorizados por la SEMARNAT. Dichos centros de acopio deberán operar sistemas de refrigeración para mantener los residuos peligrosos biológico-infecciosos a una temperatura máxima de 4°C (cuatro grados Celsius) y llevar una bitácora de conformidad con el artículo 21 del Reglamento en materia de Residuos Peligrosos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. El tiempo de estancia de los residuos en un centro de acopio podrá ser de hasta treinta días.

Recolección y transporte externo

La recolección y el transporte de los residuos peligrosos biológico-infecciosos referidos en esta Norma Oficial Mexicana, deberá realizarse conforme a lo dispuesto en los ordenamientos jurídicos aplicables y cumplir lo siguiente:

- a)** Sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado como se establece en el punto 6.2 de esta Norma Oficial Mexicana.
- b)** Los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deben ser compactados durante su recolección y transporte.
- c)** Los contenedores referidos en el punto 6.3.2 deben ser desinfectados y lavados después de cada ciclo de recolección.
- d)** Los vehículos recolectores deben ser de caja cerrada y hermética, contar con sistemas de captación de escurrimientos, y operar con sistemas de enfriamiento para mantener los residuos a una temperatura máxima de 4°C. Además, los vehículos con capacidad de carga útil de 1,000 kg o más deben operar con sistemas mecanizados de carga y descarga.
- e)** Durante su transporte, los residuos peligrosos biológico-infecciosos sin tratamiento no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o de origen industrial.

Para la recolección y transporte de residuos peligrosos biológico-infecciosos se requiere la autorización por parte de la SEMARNAT. Dicho transporte deberá dar cumplimiento con los incisos a), b), d) y e) descritos anteriormente.

Tratamiento

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados.

La operación de sistemas de tratamiento que apliquen tanto a establecimientos generadores como prestadores de servicios dentro o fuera de la instalación del generador, requieren autorización previa de la SEMARNAT, sin perjuicio de los

procedimientos que competan a la SSA de conformidad con las disposiciones aplicables en la materia.

Los residuos patológicos deben ser incinerados o inhumados, excepto aquellos que estén destinados a fines terapéuticos, de investigación y los que se mencionan en el inciso 4.3.2: “los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol”; de esta Norma Oficial Mexicana. En caso de ser inhumados debe realizarse en sitios autorizados por la SSA.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos tratados e irreconocibles, podrán disponerse como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes. Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios deberán contar con un programa de contingencias en caso de derrames, fugas o accidentes relacionados con el manejo de estos residuos. [39]

En la Norma Oficial Mexicana NOM-114-STPS-1994, SISTEMA PARA LA IDENTIFICACION Y COMUNICACION DE RIESGOS POR SUSTANCIAS QUIMICAS EN LOS CENTROS DE TRABAJO; se considera que existe una responsabilidad general para proporcionar seguridad a los trabajadores en los centros de trabajo. La comunicación sobre riesgos es una parte importante, los trabajadores deben estar capacitados para reconocer el riesgo potencial de los diversos productos químicos, en los procedimientos de operación y saber usar el Equipo de Protección Personal.

En el laboratorio se tiene un manejo constante de sustancias químicas, para la preparación de los reactivos, por ello esta norma no es de utilidad ya que la parte central de este sistema es la Identificación de los riesgos inherentes de una sustancia: riesgo sobre la salud, riesgo de inflamabilidad, riesgo de reactividad y riesgo especial. El sistema para la identificación de riesgos por sustancias químicas se complementa de una señal de seguridad, en la que la información sobre los tipos y grados de riesgo y el equipo de protección personal pueden ser identificados de una manera sencilla por todo el personal del centro laboral que

esté involucrado con el uso y manejo de dichas sustancias, así como también de una hoja de datos de seguridad que permite conocer más a la sustancia. Se establece un sistema para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas que de acuerdo a sus características físico-químicas o toxicidad, concentración y tiempo de exposición del trabajador puedan alterar su salud y su vida y/o afectar al centro de trabajo.

“La empresa debe tener un listado de las sustancias químicas que se utilizan en el centro de trabajo con la clasificación de riesgo correspondiente”.

Las especificaciones que establece el código para identificar sustancias químicas así como los recipientes que los contengan consistirá en:

- Nombre o código de la sustancia química
- Tipo y grado de riesgo
- Colores
- Forma geométrica
- Información complementaria (riesgo especial, equipo de protección personal, etc.)

En esta Norma se establece los grados de cada tipo de riesgo a la salud, inflamabilidad y reactividad: grado 4: riesgo severo; grado 3: riesgo serio; grado 2: riesgo moderado; grado 1: riesgo ligero. [44]

En nuestro campo de trabajo estamos expuestos a riesgos a nuestra salud y a poner en riesgo la salud e integridad física de las demás personas, por el material al cual estamos expuestos al realizar nuestro trabajo, portar un equipo de protección en nuestro caso es la bata de trabajo principalmente, aunque también contamos con otro tipo de protección personal para realizar nuestras actividades dentro y fuera del laboratorio según lo requiera, es por eso que las anteriores normas se complementan con la NORMA Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL-SELECCIÓN, USO Y MANEJO EN LOS CENTROS DE TRABAJO. En esta norma se “establecen los requisitos mínimos para que el patrón seleccione, adquiera y proporcione a sus trabajadores, el equipo de protección personal correspondiente para protegerlos de los agentes del medio ambiente de trabajo que puedan dañar su integridad física y su salud”. [45]

El punto 5.2 de esta norma establece las obligaciones del patrón o jefe; el cual debe identificar y analizar los riesgos a los cuales están expuestos el personal de trabajo; debe de registrarse: tipo de actividad que desarrolla el trabajador, tipo de riesgo de trabajo identificado, región anatómica por proteger, puesto de trabajo y equipo de protección personal requerido.

En el punto 5.3 determina el equipo de protección personal, que deben utilizar los trabajadores en función de los riesgos de trabajo a los que puedan estar expuestos por las actividades que desarrollan o por las áreas en donde se encuentran. En caso de que en el análisis de riesgo se establezca la necesidad de utilizar ropa de trabajo con características de protección, ésta será considerada equipo de protección personal.

El punto 5.4 establece proporcionar a los trabajadores equipo de protección personal que cumpla con las siguientes condiciones:

- a) Que atenúe la exposición del trabajador con los agentes de riesgo;
- b) Que en su caso, sea de uso personal;
- c) Que esté acorde a las características físicas de los trabajadores, y
- d) Que cuente con las indicaciones, las instrucciones o los procedimientos del fabricante para su uso, revisión, reposición, limpieza, limitaciones, mantenimiento, resguardo y disposición final.

En el punto 6. Obligaciones de los trabajadores que usen equipo de protección personal se establece: que el capacitación y adiestramiento para el uso del equipo de protección personal, revisar las condiciones del equipo antes y después de realizar sus actividades, así como darle mantenimiento al equipo según se especifique en el mismo por el proveedor.

Al paso del tiempo se han descubierto nuevas técnicas que ayudan a la ciencia forense a determinar con mayor exactitud la naturaleza de la muestra desconocida, con técnicas presuntivas y confirmatorias. Estas técnicas a su vez van siendo mejoradas para su perfección o actualización debido al avance tecnológico e intelectual del hombre para así aplicarlas de acorde a lo de hoy en

día y no llegue a ser un método obsoleto; el conocer la validez de las técnicas nos da mayor certeza y confianza que tenemos un resultado veraz y exacto a lo que nosotros necesitamos.

Sin embargo, no solo se trata de llevar a cabo las técnicas, debe haber un ¿porqué?, un ¿para qué?, un ¿Cómo? y un ¿Cuándo? que nos lleven a la práctica de estas metodologías, es decir tener un propósito que nos va a llevar a un fin, teniendo en claro que quien realiza las metodologías es una persona capacitada para realizarla, sabe lo que hace, como lo hace y por qué lo hace. Como individuos de la sociedad a la que pertenecemos debemos tener claro que hay leyes que respetar, que se nos imponen para poder ejercer nuestro trabajo, sin antes olvidar que somos servidores públicos al servicio de la sociedad, asumiendo un compromiso moral y profesionalmente.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

La fuerza del conocimiento científico radica en el carácter general, universal, necesario y objetivo de su veracidad. Para llevar a cabo científicamente una investigación se debe seguir una acción y procedimiento metódico. Para ello son necesarios ciertos elementos como el grupo que se sirve del método, el ámbito en el que se aplica y el fin que pretende alcanzarse.

En principio el método científico recurre a dos vías alternativas para elaborar los conceptos que nos permiten acercarnos al entendimiento de la realidad que nos interesa.

Nuestro estudio presenta un comportamiento inferencial o inductivo. Dicho estudio consta de una población de muestras con fluido seminal como lo son muestras de exudados vaginales, exudados anales, orina de hombre y de mujer y muestras de semen seco en varios soportes para la determinación fosfatasa ácida, proteína p30 y la presencia o ausencia de espermatozoides, con la ayuda de la técnica para la determinación de fosfatasa ácida, la tinción de los espermatozoides con la tinción de Christmas Tree, y la determinación de la proteína p30 por medio de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30 con el inmunoensayo cromatográfico del test de PSA SEMIQUANT de SERATEC[®] corroboramos los resultados obtenidos en la inmunoelectroforesis para la proteína p30.

MÉTODO

En nuestro estudio contamos con un grupo variado de muestras: exudados vaginales, exudados anales, orinas de hombres y mujeres, exudados vaginales con sangre menstrual. Estas muestras las utilizamos como controles negativos para la determinación de fosfatasa ácida.

Teniendo otro grupo de muestras positivas “soportes” como papel higiénico, periódico, toalla sanitaria, cobija, playera, preservativo, prenda íntima, vestidura de

automóvil, sabana, hisopo y un preservativo con tierra fresca; para la determinar el tiempo de reacción de la fosfatasa ácida en la muestra que contiene fluido seminal, y observar las variantes de tiempo de un soporte a otro.

Aplicamos el método inductivo para predecir el comportamiento de nuestra población de muestras a partir de la observación de los hechos, mediante la generalización del comportamiento observado en nuestro campo muestral.

Las muestras provienen de diferentes soportes como ya se explicó anteriormente; las muestras fueron conservadas en 2 condiciones, con solución salina y sin solución salina, esto para las muestras que fueron utilizadas como controles negativos para la realización de la prueba de la fosfatasa ácida, ya que queremos observar si existe variación entre las muestras conservadas con solución salina con las muestras secas, sin solución salina, esto para ver si altera el resultado de la prueba.

Se analizaron 103 muestras para la determinación de fosfatasa ácida, las muestras correspondían a exudados vaginales con y sin solución salina, exudados anales con y sin solución salina, exudados vaginales con sangre menstrual, y muestras de semen seco en varios soportes. También se realizaron diluciones a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8192, 1:16384, 1:32768 de una muestra de semen para determinar su concentración de la fosfatasa en UKA y su resultado a 1 min, 2 min, 3 min, 4 min y 5 min, también nos ayudo a determinar la concentración mínima detectada, y el comportamiento de la concentración con relación a la dilución de la muestra problema.

En la visualización de células espermáticas, espermatozoides, se observaron al microscopio 30 muestras de exudado vaginal independientes a las 103 muestras utilizadas para la fosfatasa ácida, conservadas con solución salina, a las cuales se les aplicó la técnica de Tinción de Christmas Tree en la totalidad se visualizaron espermatozoides o restos de los mismos.

Para la determinación de la proteína p30 en las muestras de exudados vaginales se tomaron 30 muestras, y la determinación se llevo a cabo por la técnica de inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30, todas las muestras dieron positivas sin excepción; además se corroboró los resultados con la técnica de inmunocromatografía de un kit comercial de PSA sin haber cambio en los resultados obtenidos por medio de la inmunoelectroforesis. Se realizaron también diluciones para determinar la concentración a las diferentes diluciones para determinar el corrimiento en cm en el gel de agarosa por parte de la muestra y consecuentemente la concentración de la proteína en cada una de las diluciones hasta que punto es detectable la proteína, las diluciones fueron, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256; y conocer la relación que hay entre la concentración de la proteína presente en la muestra con el desplazamiento obtenido en el gel.

La corroboración de resultados se dio por medio del inmunoensayo cromatográfico con el Test PSA SEMIQUANT de SERATEC®.

Método para la determinación de la enzima fosfatasa ácida se lleva a cabo, disponiendo de 2 soluciones preparadas con los siguientes reactivos y materiales:

Reactivos

- Orto Dianisidina tetrazotizada - *Sigma Aldrich*
- Acetato de sodio -*productos químicos Monterrey*
- Ácido acético glacial- *J.T. Baker*
- Agua destilada- *Hycel*
- Alfa naftil fosfato de sodio - *Sigma Aldrich*

Materiales y métodos

- Matraz Erlenmeyer
- Agitador mecánico
- Vaso de precipitados
- Pipetas Pasteur
- Frasco ámbar

Las soluciones se preparan por simple adición, las soluciones tienen que estar en refrigeración y almacenadas en frascos ámbar.

La técnica que se realizó para esta determinación, es la siguiente:

TABLA 3 Reactivos utilizados para preparación de solución 1 y 2 para la determinación de la fosfatasa ácida

SOLUCIÓN 1	
REACTIVO	CANTIDAD
Orto Dianisidina tetrazotizada	1g
Acetato de sodio	20g
Acido acético	10g
Agua destilada	100mL
SOLUCIÓN 2	
Alfa naftil fosfato de sodio	0.8g
Acetato de sodio	20g
Acido acético	10g
Agua destilada	10mL

Mezclar 10 mL de solución 1; 89 mL de agua destilada y 1.0 mL de la solución 2. Guardar en un frasco ámbar y en refrigeración a 4° C.

Procedimiento

- 1.- La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra.
- 2.- Se colocan entre dos hojas de papel filtro.
- 3.- Lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo.
- 4.- Se colocan sobre la lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: testigo negativo; muestra problema y testigo positivo.
- 5.- Inmediatamente después se agregan aproximadamente 10 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Pasteur.

La interpretación de los resultados de esta prueba: si presenta coloración violeta intensa, indica presencia de fosfatasa ácida es positivo el resultado; si no presenta dicha coloración no se encuentra fosfatasa ácida en la muestra es un resultado negativo.

Método Para la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para proteína p30 se utilizaron:

Reactivos:

- Anti-p30 (A404-5 Lot # 200201) *Separation of Gene Amp PCR Products, Omega Reactivos de Diagnostico S.A. de C.V*
- Solución salina 0.85%
- Agarosa al 1%
- Amortiguador TBE pH1%
- Colorante Azul de Coomassie 1%
- Decolorante I
- Decolorante II
- Test PSA SEMIQUANT de SERATEC® (para corroboración de resultados)

Materiales y métodos:

- Tubo de ensayo
- Probeta graduada de 50 mL
- Pipetas graduadas
- Pipeta 100µl
- Centrifuga
- Termómetro
- Peine para gel de electroforesis
- cámara electroforética QCA-ECEF-02
- fuente de poder QCA-ECEF-01
- agitador LAB-LINE.

El proceso que se realiza para llevar a cabo la inmunoelectroforesis de Cohete convencional modificada para proteína p30, adaptada en el laboratorio es la siguiente: [46]

1.-El hisopo que contiene la muestra de exudado vaginal, se cubre con 1 mL de solución salina al 0.85 %, *ver anexo A*; y se deja macerar por 2 horas aproximadamente.

2.-Retirar el hisopo del tubo y centrifugar a 2000 rpm, por 3 min aproximadamente; al igual que los controles positivo y negativo.

3.-Preparar una solución de agarosa al 1%, *ver anexo A*; medir un volumen de 15 mL de solución de agarosa al 1%, dejar reposar la solución, aproximadamente 12 min, hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 55°C, enseguida adicionar 75 µl de anti-p30 y verter inmediatamente a una placa de 6 x 8 cm; colocar el peine de 10 pocillos y dejar solidificar por aproximadamente 15 min.

4.-Colocar el gel de agarosa dentro de la cámara electroforética. Agregar amortiguador TBE pH 9.1, *ver anexo A*, a la cámara electroforética hasta cubrir totalmente el gel. Aplicar en los pocillos 2 µl de la muestra a analizar así como del control positivo y negativo.

5.-Cerrar la cámara electroforética QCA-ECEF-02, encender la fuente de poder QCA-ECEF-01, programar a 120 volts por 30 min.

6.-Retirar el gel de agarosa de la cámara electroforética y colocarlo en una pequeña charola, realizar un lavado con solución salina al 0.85 % a temperatura ambiente, agregar colorante azul de coomassie al 1%, *ver anexo A*, hasta cubrir el gel, por 20 min, agitando suavemente cada 5 min, en agitador LAB-LINE.

7.-Desechar el colorante y adicionar solución decolorante I, *ver anexo A*, durante 2 horas, cambiando cada 20 min la solución, posteriormente adicionar la solución decolorante II, *ver anexo A*, durante 1 hora, cambiando cada 20 min la solución; todo el proceso de decoloración se realiza a movimiento constante, en agitador LAB-LINE.

8.-Observar corrimiento en estela o cohete, en los respectivos pocillos del gel de agarosa.

Para la preparación los reactivos *ver Anexo A*.

Método para la Tinción de Christmas Tree, se lleva a cabo con la preparación de los dos colorantes aplicados en la tinción, el colorante rojo rápido nuclear y el colorante índigo carmín; los resultados es la visualización de la presencia de espermatozoides el núcleo se presenta de color rojo, el acrosoma y la cola de color verde, como ya se vio anteriormente.

Reactivos:

- Rojo rápido nuclear
- Sulfato de Aluminio
- Agua destilada
- Acido pícrico
- Índigo carmín

Materiales y métodos:

- Parrilla eléctrica
- Agitador de magnético
- 2 Vasos de precipitados 250 mL
- 2 frascos gotero ámbar

El método que se realiza para esta tinción es el siguiente:

TABLA 4 Reactivos utilizados para preparación de colorantes para la tinción Christmas Tree

COLORANTE ROJO RÁPIDO NUCLEAR	
REACTIVO	CANTIDAD
Rojo rápido nuclear	50mg
Sulfato de Aluminio	2.5g
Agua destilada	100mL
COLORANTE ÍNDIGO CARMÍN	
Acido pícrico	1.3 g
Índigo Carmín	0.23g
Agua destilada	100mL

Colorante rojo rápido nuclear

- 1.- Calentar a ebullición, los 100 mL, de agua destilada y disolver en ellos el sulfato de aluminio.
- 2.- Adicionar el colorante rojo rápido nuclear; mezclar con agitador mecánico, hasta disolución completa.
- 3.- Enfriar y filtrar en papel Wathman No.1 almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Colorante de índigo carmín:

- 1.- Disolver en ácido pícrico en los 100 mL de agua.
- 2.- Añadir los 0.23 gramos de índigo carmín; mezclar perfectamente con agitador mecánico.
- 3.- Guardar en frasco gotero ámbar.

Procedimiento

- 1.- Una vez fijado el frotis con calor, añadir 2 gotas de rojo rápido nuclear.

- 2.- Dejarlo reposar en cámara húmeda durante 15 min, pudiéndose utilizar una caja de Petri, colocando en la base y el interior de la tapa, un papel filtro húmedo.
- 3.- Lavar con agua desionizada, durante 5 segundos.
- 4.- Añadir una gota del colorante número 2 y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.
- 5.-Lavar con etanol absoluto para decolorar, secar por 5 min.

Como se mencionó en el capítulo 2 una vez realizada la tinción, si se encuentran espermatozoides en la muestra al observar al microscopio, el núcleo del espermatozoide, aparecerá en color rojo; el acrosoma y la cola, de color verde.

Las pruebas realizadas se llevaron a cabo en las muestras problema de las 103 muestras que tuvimos en total a 30 de ellas se les aplicó las 3 pruebas, esto para corroborar el resultado entre un método y otro, las 30 muestras eran fluido seminal.

Con el análisis de los resultados obtenidos se determina, la sensibilidad, especificidad, selectividad, límite de detección de cada una de las pruebas aplicadas; así mismo los resultados obtenidos nos ayudarán a verificar las posibles variables entre un método y otro, para determinar si las técnicas utilizadas en el laboratorio cumplen con los parámetros establecidos y las especificaciones particulares para lo que son aplicados y quede entonces validado (os) por los organismos de acreditación y certificación en este caso la ema.

Para que esto se cumpla los resultados son sometidos a un análisis estadístico el cual nos ayuda a comprobar si se están cumpliendo los parámetros en cada una de las técnicas. Cabe señalar que el estadístico de prueba depende de la naturaleza del método en nuestro caso son métodos cualitativos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS ESTUDIO SEMINOLÓGICO

Una vez realizadas cada una las técnicas de la manera especificada en el capítulo 2, se procedió a la recolección y organización de los datos, para cada una de las pruebas se obtuvieron los siguientes resultados. Los cuales fueron analizados estadísticamente con el estadístico de prueba que se considero más adecuado a la naturaleza de los datos obtenidos, en estos casos como se verá más adelante se utilizaron las tablas de contingencia.

Resultados de la determinación de fosfatasa ácida

La tabla 5, nos ayuda a conocer si las muestras son positivas o negativas para incorporarlas a nuestra población muestral, ya que al llegar las muestras desconocemos de donde provienen y la naturaleza de las mismas.

TABLA 5 Resultados preliminares de la prueba de cribado al aplicar la técnica de identificación de fosfatasa ácida

CLAVE	RESULTADO	CLAVE	REACCION	CLAVE	RESULTADO
1'	Negativo	11'	Positivo	21'	Positivo
2'	Positivo	12'	Positivo	22'	Positivo
3'	Positivo	13'	Positivo	23'	Positivo
4'	Negativo	14'	Positivo	24'	Positivo
5'	Positivo	15'	Positivo	25'	Positivo
6'	Positivo	16'	Positivo	26'	Positivo
7'	Positivo	17'	Positivo	27'	Positivo
8'	Positivo	18'	Positivo	28'	Positivo
9'	Positivo	19'	Negativo	29'	Positivo
10'	Positivo	20'	Negativo	30'	Positivo

En nuestro estudio se tuvieron muestras negativas y positivas, así como soportes negativos y positivos, que integraron nuestra población, en la tabla 6 se especifica las condiciones de cada uno, el soporte que contenía la muestra y el resultado que se presentó al realizar la determinación de fosfatasa ácida.

TABLA 6 Resultados de las muestras a las que se les determino fosfatasa ácida

ORDEN	CLAVE	ESPECIMEN	SOPORTE	RESULTADOS
01	01	Orina de hombre. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
02	73	Exudado vaginal No. 30'	HISOPO	POSITIVO
03	67	Orina de mujer. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
04	04	Orina de hombre. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
05	46	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
06	74	Exudado vaginal No. 29'	HISOPO	POSITIVO
07	07	Orina de hombre. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO
08	18	Semen humano seco	VESTIDURA DE AUTO	POSITIVO
09	09	Orina de hombre. Muestra 9	HISOPO	NEGATIVO
10	75	Exudado vaginal No. 28'	HISOPO	POSITIVO
11	11	Semen humano seco	PAPEL HIGIÉNICO	POSITIVO
12	65	Orina de mujer. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
13	41	Exudado anal con solución salina. Muestra 10	HISOPO	NEGATIVO
14	76	Exudado vaginal No. 27'	HISOPO	POSITIVO
15	62	Exudado anal sin solución salina. Muestra 10	HISOPO	NEGATIVO
16	16	Semen humano seco	PRESERVATIVO MARCA SICO	POSITIVO
17	36	Exudado anal con solución salina. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
18	77	Exudado vaginal No. 26'	HISOPO	POSITIVO
19	19	Semen humano seco	SABANA	POSITIVO
20	44	Exudado vaginal con sangre menstrual sin solución salina Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO

ORDEN	CLAVE	ESPECIMEN	SOPORTE	RESULTADOS
21	21	Semen humano seco	PRESERVATIVO CON TIERRA	POSITIVO
22	22	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
23	10	Orina de hombre. Muestra 10	HISOPO	NEGATIVO
24	78	Exudo vaginal No. 25'	HISOPO	POSITIVO
25	25	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
26	58	Exudado anal sin solución salina. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
27	27	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
28	79	Exudado vaginal No. 24'	HISOPO	POSITIVO
29	68	Orina de mujer. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
30	30	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 9	HISOPO	NEGATIVO
31	37	Exudado anal con solución salina. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
32	38	Exudado vaginal No. 23'	HISOPO	POSITIVO
33	33	Exudado anal con solución salina. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
34	60	Exudado anal sin solución salina. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
35	35	Exudado anal con solución salina. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
36	17	Semen humano seco	PRENDA ÍNTIMA	NEGATIVO
37	31	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 10	HISOPO	NEGATIVO
39	80	Exudado vaginal No. 22'	HISOPO	POSITIVO
39	50	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
40	40	Exudado anal con solución salina. Muestra 9	HISOPO	NEGATIVO
41	13	Semen humano seco	TOALLA SANITARIA	POSITIVO
42	81	Exudado vaginal No. 21'	HISOPO	POSITIVO

ORDEN	CLAVE	ESPECIMEN	SOPORTE	RESULTADOS
43	43	Exudado vaginal con sangre menstrual sin sol. Sal muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
44	20	Semen humano seco	HISOPO	POSITIVO
45	45	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
46	82	Exudado Vaginal No. 21'	HISOPO	POSITIVO
47	47	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
48	83	Exudado vaginal No. 20'	HISOPO	NEGATIVO
49	49	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
50	84	Exudado vaginal No. 19'	HISOPO	NEGATIVO
51	51	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO
52	06	Orina de hombre. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
53	85	Exudado vaginal No. 18'	HISOPO	POSITIVO
54	42	Exudado vaginal con sangre menstrual sin sol. Sal. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
55	55	Exudado anal sin solución salina. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
56	86	Exudado vaginal No. 17'	HISOPO	POSITIVO
57	57	Exudado anal sin solución salina. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
58	87	Exudado vaginal No. 16'	HISOPO	POSITIVO
59	73	Orina de mujer. Muestra 10	HISOPO	NEGATIVO
60	34	Exudado anal con solución salina. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
61	88	Exudado vaginal No. 15'	HISOPO	POSITIVO
62	15	Semen humano seco	PLAYERA	POSITIVO
63	64	Orina de mujer. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
64	12	Semen humano seco	PAPEL PERIÓDICO	POSITIVO
65	89	Exudado vaginal No. 14'	HISOPO	POSITIVO
66	03	Orina de hombre. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
67	90	Exudado vaginal No. 13'	HISOPO	POSITIVO

ORDEN	CLAVE	ESPECIMEN	SOPORTE	RESULTADOS
68	69	Orina de mujer. Muestra 6	HISOPO	NEGATIVO
69	91	Exudado Vaginal No. 12'	HISOPO	POSITIVO
70	24	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
71	92	Exudado vaginal No. 11'	HISOPO	POSITIVO
72	59	Exudado anal sin solución salina. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO
73	93	Exudado vaginal No. 10'	HISOPO	POSITIVO
74	52	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
75	23	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
76	14	Semen humano seco	COBIJA	POSITIVO
77	94	Exudado vaginal No. 9'	HISOPO	POSITIVO
78	71	Orina de mujer. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
79	28	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO
80	95	Exudado vaginal No. 8'	HISOPO	POSITIVO
81	38	Exudado anal con solución salina. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO
82	96	Exudado vaginal No. 7'	HISOPO	POSITIVO
83	05	Orina de hombre. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
84	32	Exudado anal con solución salina. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
85	97	Exudado vaginal No. 6'	HISOPO	POSITIVO
86	53	Exudado anal sin solución salina. Muestra 1	HISOPO	NEGATIVO
87	98	Exudado vaginal No. 5'	HISOPO	POSITIVO
88	26	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 5	HISOPO	NEGATIVO
89	99	Exudado vaginal No. 4'	HISOPO	NEGATIVO
90	100	Exudado vaginal No. 3'	HISOPO	POSITIVO
91	29	Exudado vaginal con solución salina. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
92	70	Orina de mujer. Muestra 7	HISOPO	NEGATIVO

ORDEN	CLAVE	ESPECIMEN	SOPORTE	RESULTADOS
93	72	Orina de mujer. Muestra 9	HISOPO	NEGATIVO
94	101	Exudado vaginal No. 2'	HISOPO	POSITIVO
95	08	Orina de hombre. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
96	48	Exudado vaginal sin solución salina. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
97	102	Exudado vaginal No. 1'	HISOPO	NEGATIVO
98	39	Exudado anal con solución salina. Muestra 8	HISOPO	NEGATIVO
99	02	Orina de hombre. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO
100	61	Exudado anal sin solución salina. Muestra 9	HISOPO	NEGATIVO
101	66	Orina de mujer. Muestra 3	HISOPO	NEGATIVO
102	56	Exudado anal sin solución salina. Muestra 4	HISOPO	NEGATIVO
103	54	Exudado anal sin solución salina. Muestra 2	HISOPO	NEGATIVO

Se aplica una tabla de contingencia 2 x 2 como lo muestra la tabla 7.

TABLA 7 Tabla de contingencia 2x2 estructurada de los resultados obtenidos de la determinación de fosfatasa ácida

Variable	Presencia	Ausencia	Combinación
+	37	0	37
-	4	66	70
TOTAL	41	66	107

Se aplicó la prueba de independencia tabla de contingencia 2x2 como se expresa en el *Anexo B* con este test se puede calcular los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN), teniendo los siguientes resultados.

Sensibilidad=90.24%

Especificidad= 100%

VPP= 100% Quiere decir que existe un 100% de que las muestras presenten fosfatasa ácida al aplicar la técnica y da un resultado positivo

VPN= 94.28% existe un 94.28% de que las muestras no presenten fosfatasa ácida al aplicar la técnica y da un resultado negativo

Se evaluó la tabla 7 con la prueba de χ^2 como se expresa en el Anexo B dando un valor de

Dado que el valor calculado de la χ^2 para un nivel de confianza del 95% (5% nivel de significación) es mayor que el valor obtenido χ^2_{tab} se rechaza la hipótesis nula de dependencia entre los factores.

La tabla 8 muestra la concentración que una muestra de semen presenta a las diferentes diluciones, y en un transcurso de tiempo determinado, esto nos ayuda a determinar el límite de detección de la fosfatasa ácida. Minuto 1 T1, minuto 2 T2...minuto 5 -T5.

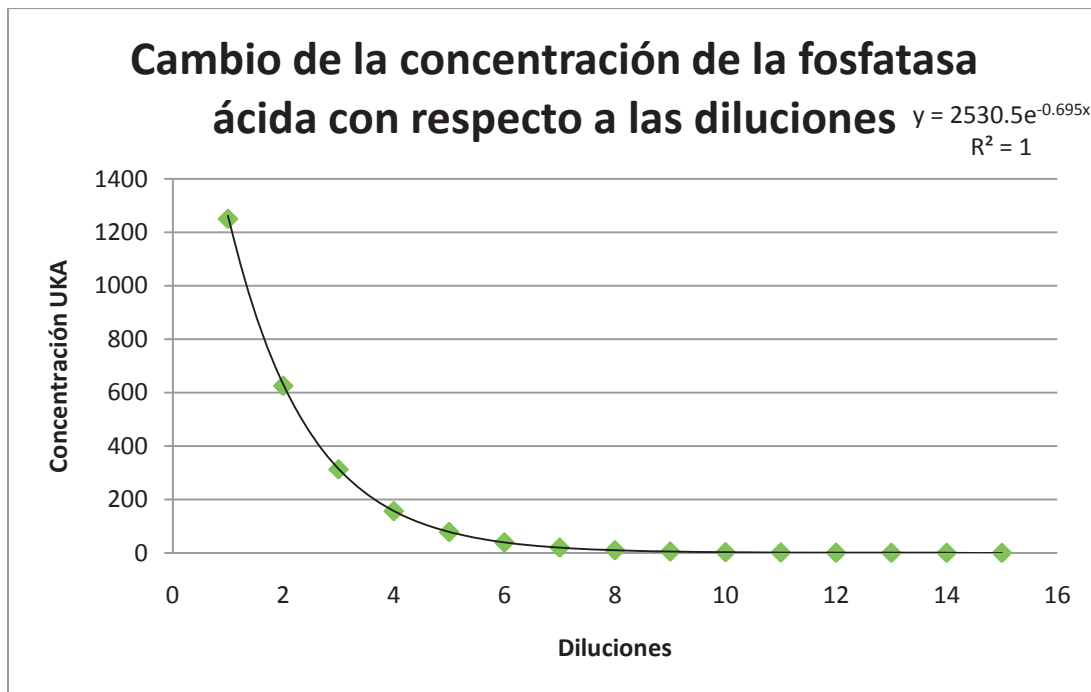
TABLA 8 Resultados de la determinación de fosfatasa ácida a las muestras a diferentes diluciones en diferentes tiempos

DILUCIONES	SEMEN	AGUA DESTILDA	[] UKA	1 MIN T1	2 MIN T2	3 MIN T3	4 MIN T4	5 MIN T5
1:2	200 µL	200 µL	1250	+	+	+	+	+
1:4	200 µL	200 µL	625	+	+	+	+	+
1:8	200 µL	200 µL	312.5	+	+	+	+	+
1:16	200 µL	200 µL	156.25	+	+	+	+	+
1:32	200 µL	200 µL	78.13	+	+	+	+	+
1:64	200 µL	200 µL	39.06	+	+	+	+	+
1:128	200 µL	200 µL	19.53	+	+	+	+	+
1:256	200 µL	200 µL	9.77	+	+	+	+	+
1:512	200 µL	200 µL	4.88	+	+	+	+	+
1:1024	200 µL	200 µL	2.44	+	+	+	+	+
1:2048	200 µL	200 µL	1.22	-	-	+	+	+
1:4096	200 µL	200 µL	0.61	-	-	+	+	+
1:8192	200 µL	200 µL	0.31	-	-	-	-	-
1:16384	200 µL	200 µL	0.15	-	-	-	-	-
1:32768	200 µL	200 µL	0.07	-	-	-	-	-

Resultado positivo (+)

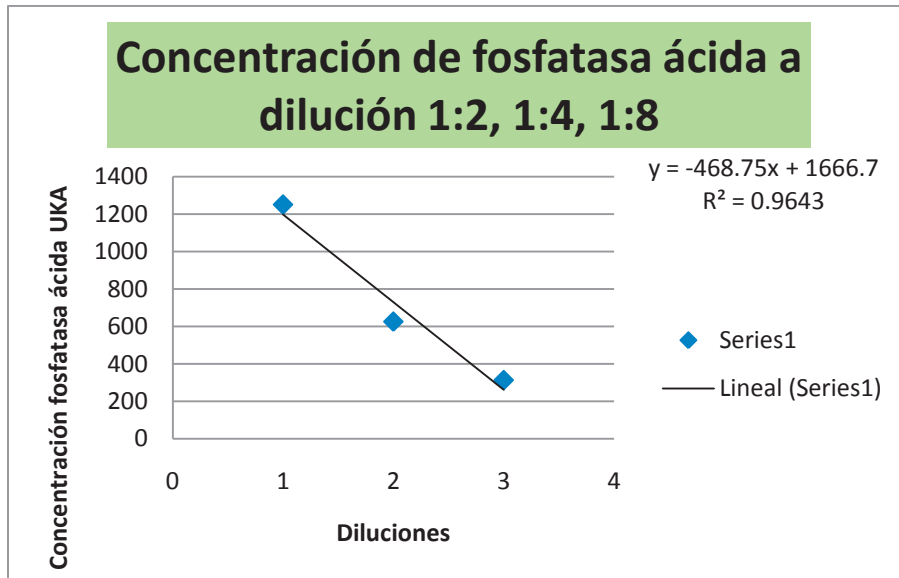
Resultado negativo (-)

Se muestra en la gráfica 1 el comportamiento exponencial que presenta la concentración de fosfatasa ácida presente en las muestras a las diferentes diluciones. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la fosfatasa ácida y la dilución de la muestra.

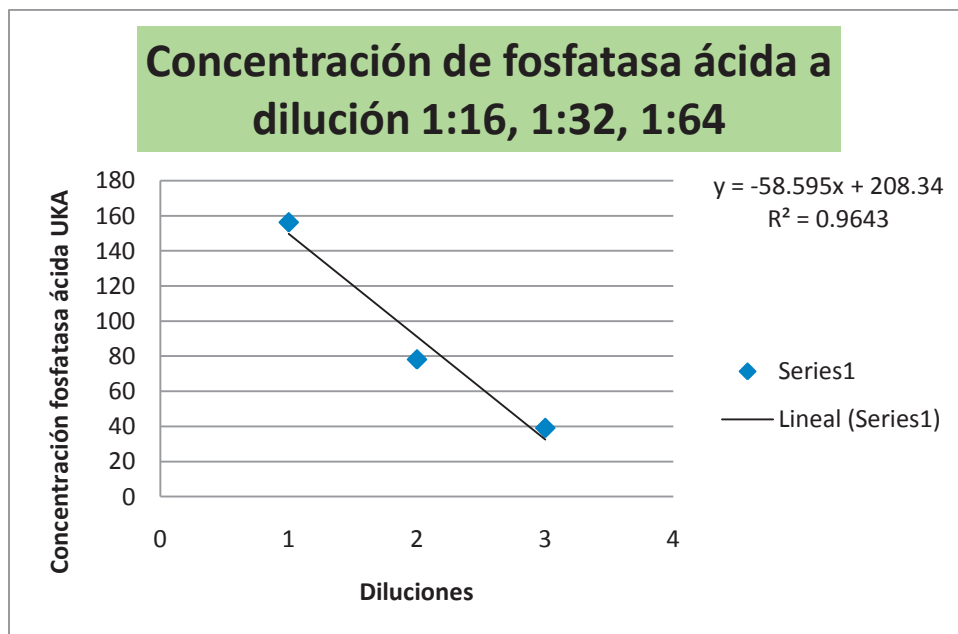


GRÁFICA 1 Concentración de la fosfatasa ácida a diferentes diluciones

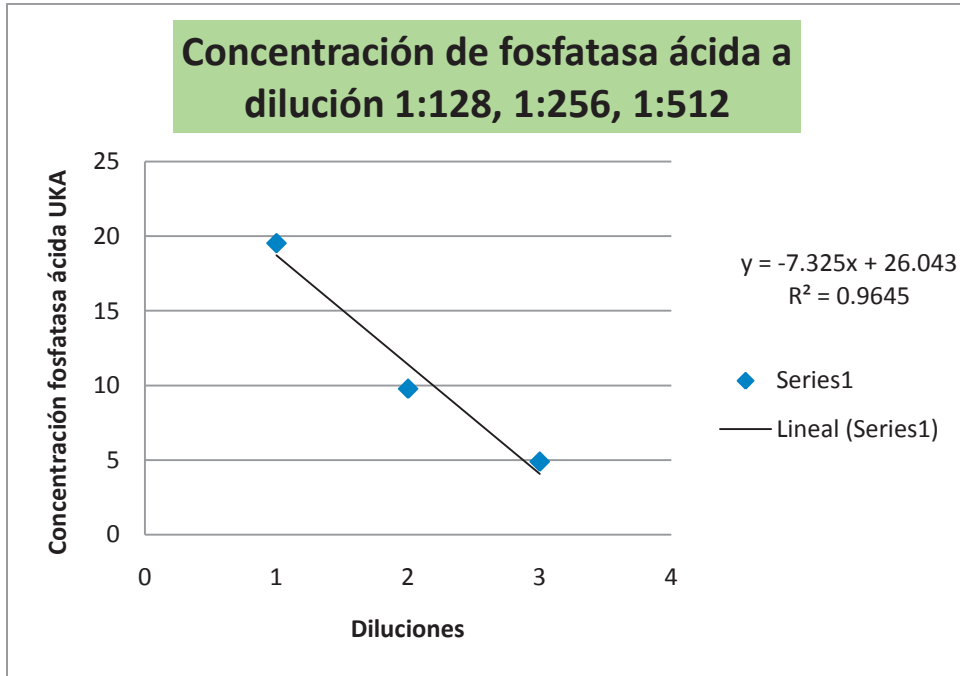
Las gráficas 1a), 1b), 1c), 1d) y 1e) muestran el comportamiento de la concentración de fosfatasa ácida a los diferentes intervalos de diluciones manteniendo una linealidad.



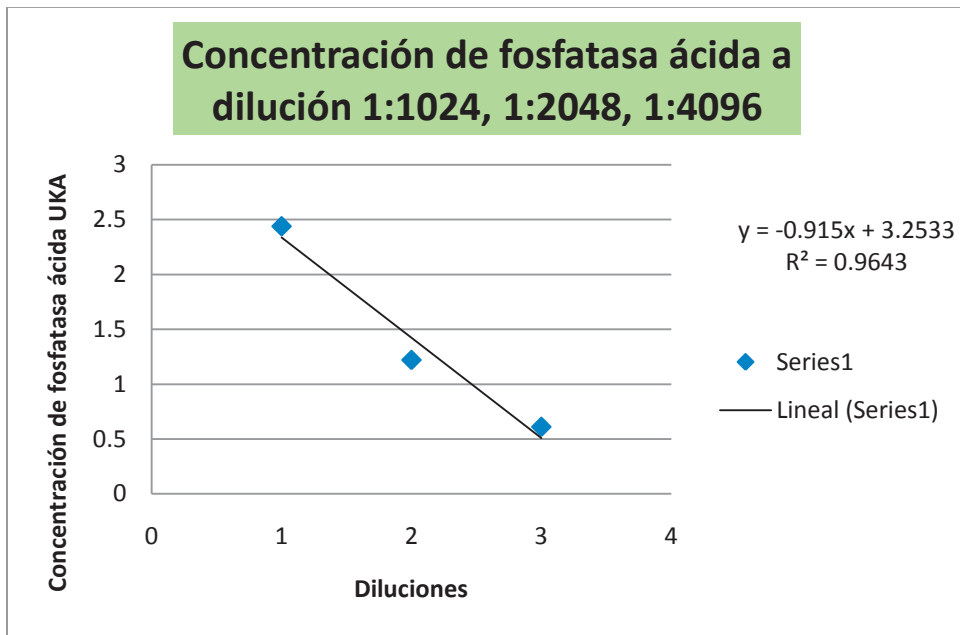
GRÁFICA 1, a) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:2, 1:4, 1:8



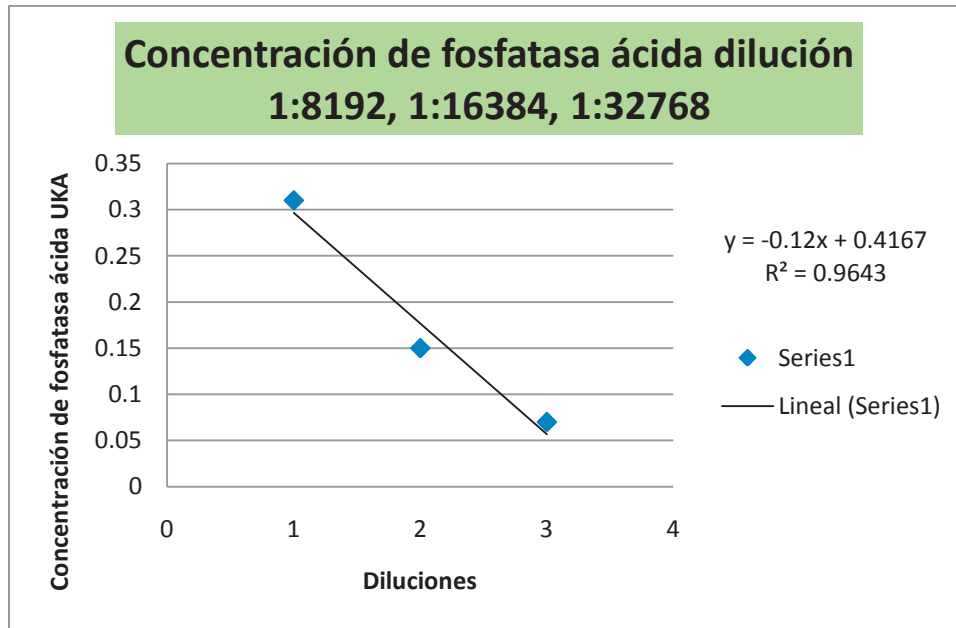
GRÁFICA 1, b) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:16, 1:32, 1:64



GRÁFICA 1, c) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:128, 1:256, 1:512



GRÁFICA 1, d) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:1024, 1:2048, 1:4096



GRÁFICA 1, e) Concentración de la fosfatasa ácida a diluciones 1:8192 1:16384, 1:32768

La gráfica 2 representa los resultados obtenidos en las diferentes diluciones transcurrido 1 min de la primera prueba que se le realizó a la muestra de semen para la determinación de fosfatasa ácida. Las primeras 10 diluciones muestran un resultado positivo al instante.



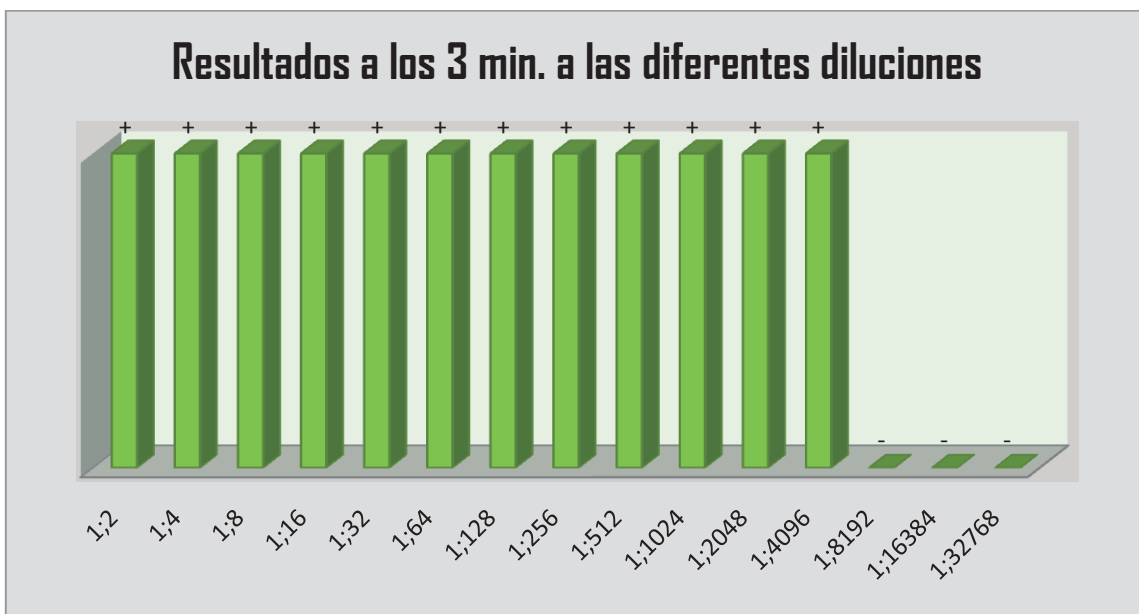
GRÁFICA 2 Resultados presentados al T1, en las diferentes diluciones

La gráfica 3 muestra los resultados obtenidos en las diferentes diluciones transcurridos 2 min de la primera prueba que se le realizó a la muestra de semen para la determinación de fosfatasa ácida. Las primeras 10 diluciones siguen mostrando un resultado positivo.



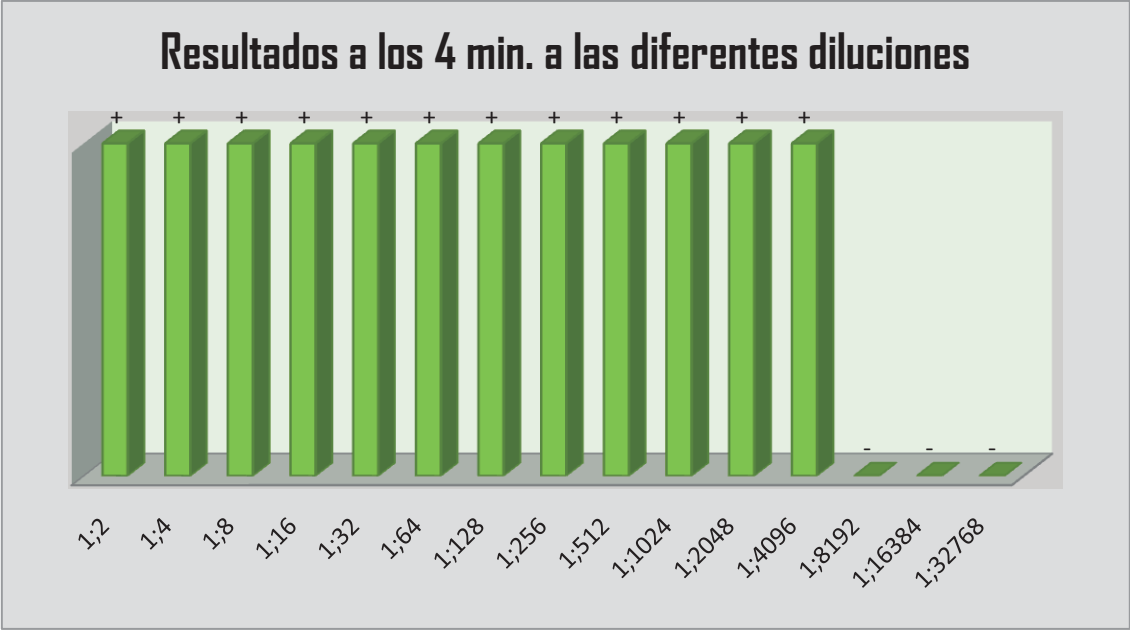
GRÁFICA 3 Resultados presentados al T2, en las diferentes diluciones

La gráfica 4 muestra los resultados obtenidos en las diferentes diluciones transcurridos 3 min de la primera prueba que se le realizó a la muestra de semen para la determinación de fosfatasa ácida. Las primeras 12 diluciones muestran un resultado positivo para la prueba, aquí ya reaccionó la fosfatasa ácida de la muestra diluida 1:2048 y en 1:4096 por la concentración de fosfatasa ácida presente en las muestras al ser menor lleva un poco más de tiempo la reacción pero no debe de ser mayor a 5 min.



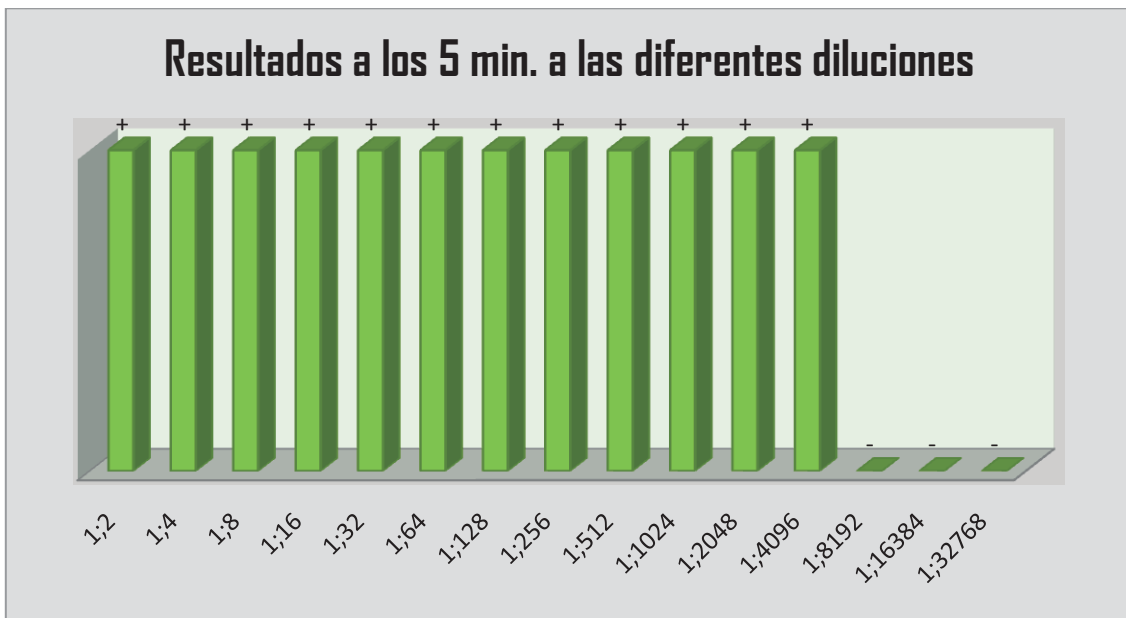
GRÁFICA 4 Resultados presentados al T3 en las diferentes diluciones

La gráfica 5 muestra los resultados obtenidos de la muestra de semen para la determinación de fosfatasa ácida. Las primeras 12 diluciones muestran un resultado positivo transcurridos 4 min de la primera determinación.



GRÁFICA 5 Resultados presentados al T4 en las diferentes diluciones

La gráfica 6 muestra los resultados obtenidos de la muestra de semen para la determinación de fosfatasa ácida. Las primeras 12 diluciones muestran un resultado positivo transcurridos 5 min de la primera determinación. Las tres últimas diluciones ya no reaccionaron aun con el paso del tiempo ya que la concentración de fosfatasa ácida presente en la muestra diluida a esas concentraciones, es tan mínima que no reacciona con el reactivo y da un resultado negativo.



GRÁFICA 6 Resultados presentados al T5 en las diferentes diluciones

En la tabla 9, se muestran los resultados obtenidos por diferentes químicos en la visualización al microscopio de células espermáticas del mismo conjunto de muestras, así como los resultados de un experto forense. Esto nos muestra que hay reproducibilidad en los resultados obtenidos.

Resultados de Visualización de células espermáticas por medio de la tinción

TABLA 9 Resultados de la visualización de células espermáticas al microscopio, con la tinción Christmas Tree

No. De muestra	QUIMICO 1	QUIMICO 2	QUIMICO 3	EXPERTO FORENSE
1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
10	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
11	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
12	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
13	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
14	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
15	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
16	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
19	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
20	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
21	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
22	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
23	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
25	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
26	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
27	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
28	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
29	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
30	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Resultados de la determinación de proteína p30 por inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada.

La tabla 10 muestra los resultados obtenidos en la identificación de la proteína p30 por medio de inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30, para corroborar los resultados obtenidos las muestras a su vez fueron procesadas para la determinación de la proteína p30 también por el método inmunocromatográfico, dando los mismos resultados obtenidos con el primer método.

TABLA 10 Identificación de proteína p30 en muestras de exudados vaginales

CLAVE	RESULTADO	CLAVE	RESULTADO	CLAVE	RESULTADO
1'	Negativo	11'	Positivo	21'	Positivo
2'	Positivo	12'	Positivo	22'	Positivo
3'	Positivo	13'	Positivo	23'	Positivo
4'	Positivo	14'	Positivo	24'	Positivo
5'	Positivo	15'	Positivo	25'	Positivo
6'	Positivo	16'	Positivo	26'	Positivo
7'	Positivo	17'	Positivo	27'	Positivo
8'	Positivo	18'	Positivo	28'	Positivo
9'	Positivo	19'	Positivo	29'	Positivo
10'	Positivo	20'	Positivo	30'	Positivo

En la imagen 1 se presenta un resultado positivo para la muestra No. 17, con la aparición de la banda del control y el de la muestra problema; y en la imagen 2 de la derecha se presenta un resultado negativo para la muestra No. 1, con la aparición de la banda del control y la ausencia de la banda de la muestra problema. Se corroborando los resultados obtenidos para dichas muestras con los anteriormente obtenidos por medio de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



Imagen 1: Corroboración de la muestra 17' para determinación de p30 por medio del test inmunocromatográfico

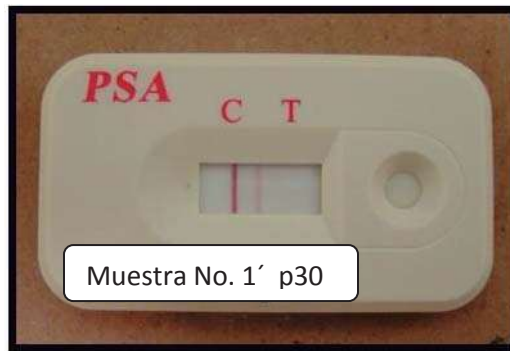


Imagen 2: Corroboración de la muestra 1' para determinación de p30 por medio del test inmunocromatográfico

RESULTADOS

Se aplica una tabla de contingencia 2 x 2 dando como se muestra en la tabla 11

TABLA 11 Tabla de contingencia 2x2 estructurada de los resultados obtenidos en la tabla 10

Resultado	Presencia	Ausencia	TOTAL
Positivo	29	0	29
Negativo	0	1	1
TOTAL	29	1	30

Se aplicó la prueba de independencia tabla de contingencia 2x2 como se expresa en el Anexo B con este test se puede calcular los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN), teniendo los siguientes resultados:

Sensibilidad=100%

Especificidad= 100%

Valores predictivos positivos (VPP)= 100% Quiere decir que existe un 100% de que las muestras se encuentre proteína p30 al aplicar la técnica y da un resultado positivo.

Valores predictivos negativos (VPN) = 100% existe un 100% de que las muestras se encuentre proteína p30 al aplicar la técnica y da un resultado negativo.

Se evaluó la tabla con el la prueba de como se expresa en el *Anexo B* dando un valor de

Dado que el valor calculado de la para un nivel de confianza del 95% (5% nivel de significación) es mayor que el valor obtenido se rechaza la hipótesis nula de dependencia entre los factores.

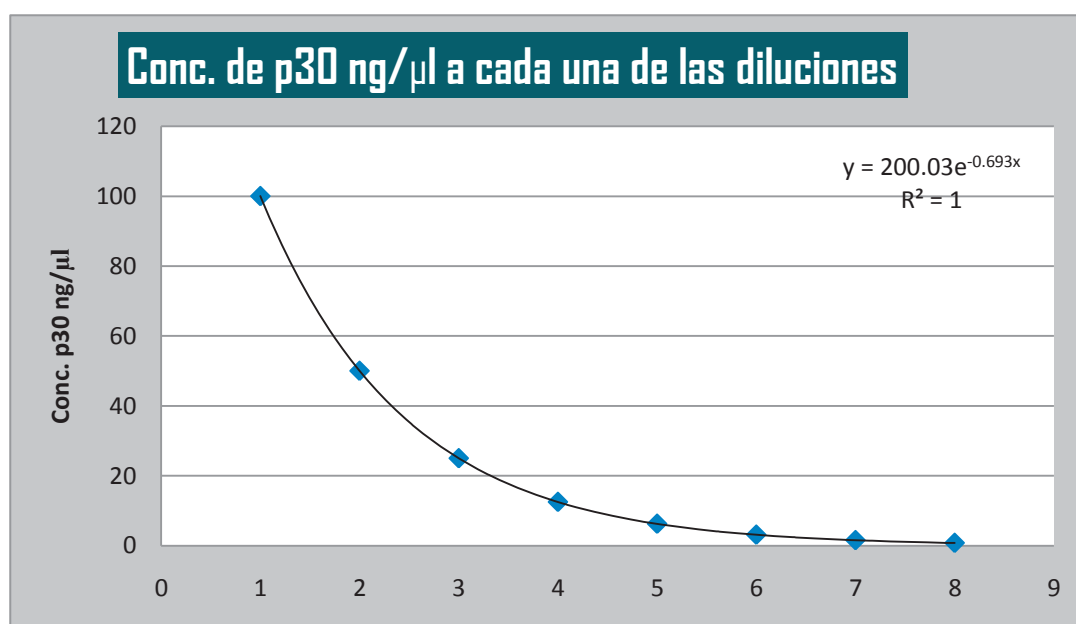
Se realizo la prueba para determinar la concordancia entre los dos métodos utilizados para la determinación de la proteína p30 (inmunoelectroforesis e inmunocromatografía), los resultados por ambas pruebas fueron los mismos expresados anteriormente en la tabla 10, se utilizo el índice Kappa ver Anexo B, dando un grado de concordancia igual a 1 es decir los resultados para la determinación de proteína p30 por inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30 congruentes con los obtenidos por el método de inmunocromatografía.

Se muestra en la tabla 12 la relación de 8 muestras a diferentes diluciones, se les determinó la concentración en ng/ µl de proteína p30 presente en la muestra; esto para determinar el límite de detección.

TABLA 12 Relación de la concentración de la p30 a diferentes diluciones

No. de muestra	DILUCIÓN	TBE PH 9.1	SEMEN	p30 ng/μl
1	1:2	25 μL	25 μL de semen	100 ng/ μL
2	1:4	25 μL	25 μL de dilución 1	50 ng/ μL
3	1:8	25 μL	25 μL de dilución 2	25 ng/ μL
4	1:16	25 μL	25 μL de dilución 3	12.5 ng/ μL
5	1:32	25 μL	25 μL de dilución 4	6.25 ng/ μL
6	1:64	25 μL	25 μL de dilución 5	3.125 ng/ μL
7	1:128	25 μL	25 μL de dilución 6	1.562 ng/ μL
8	1:256	25 μL	25 μL de dilución 7	0.781 ng/ μL

La gráfica 7 muestra el comportamiento exponencial de la concentración de la proteína p30 en relación con la dilución de la muestra que la contiene. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y la dilución de la muestra.



GRÁFICA 7 Concentración de proteína p30 a las diferentes diluciones

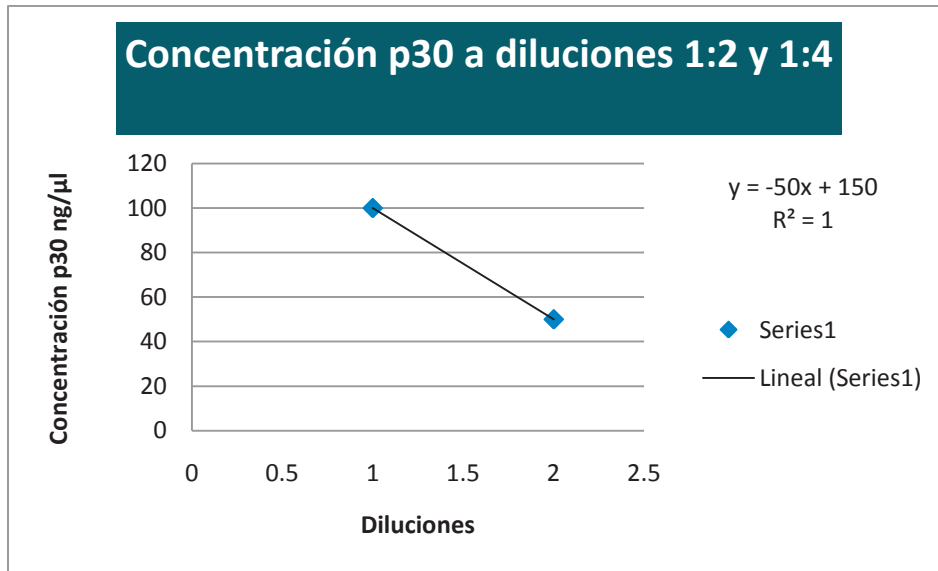


GRAFICO 7, a): Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:2 y 1:4

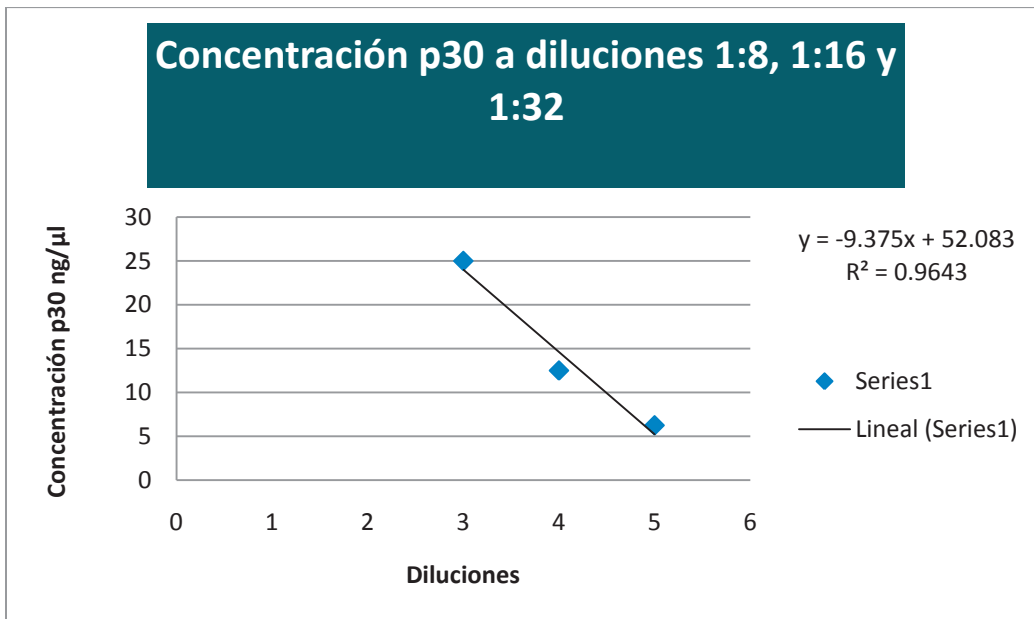


GRAFICO 7, b): Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:8, 1:16 y 1:32

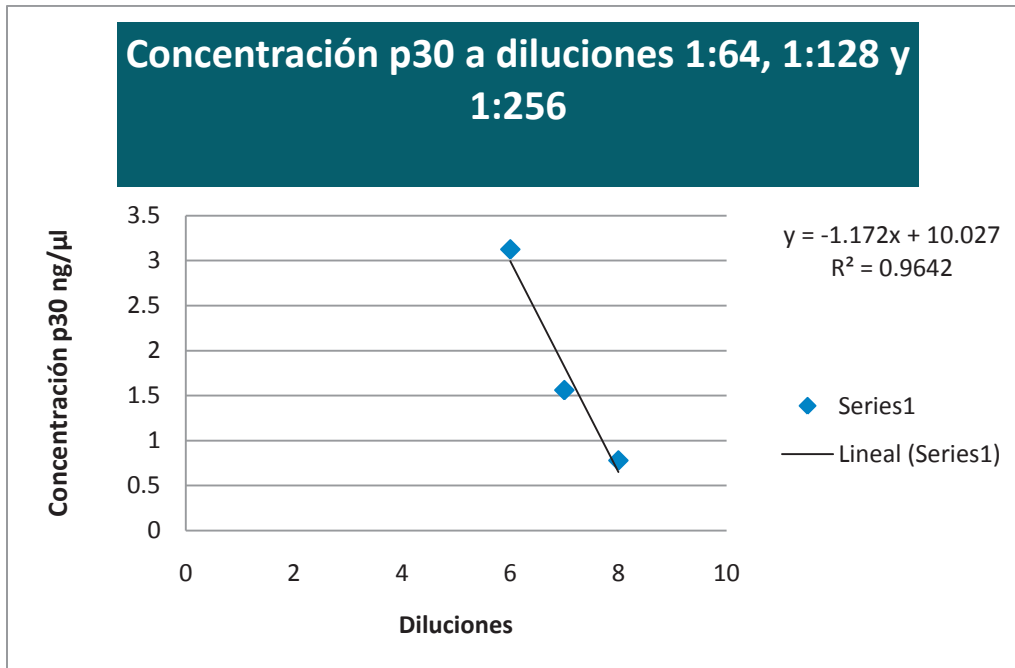


GRAFICO 7, c): Concentración de la proteína p30 a diluciones 1:64, 1:128 y 1:256

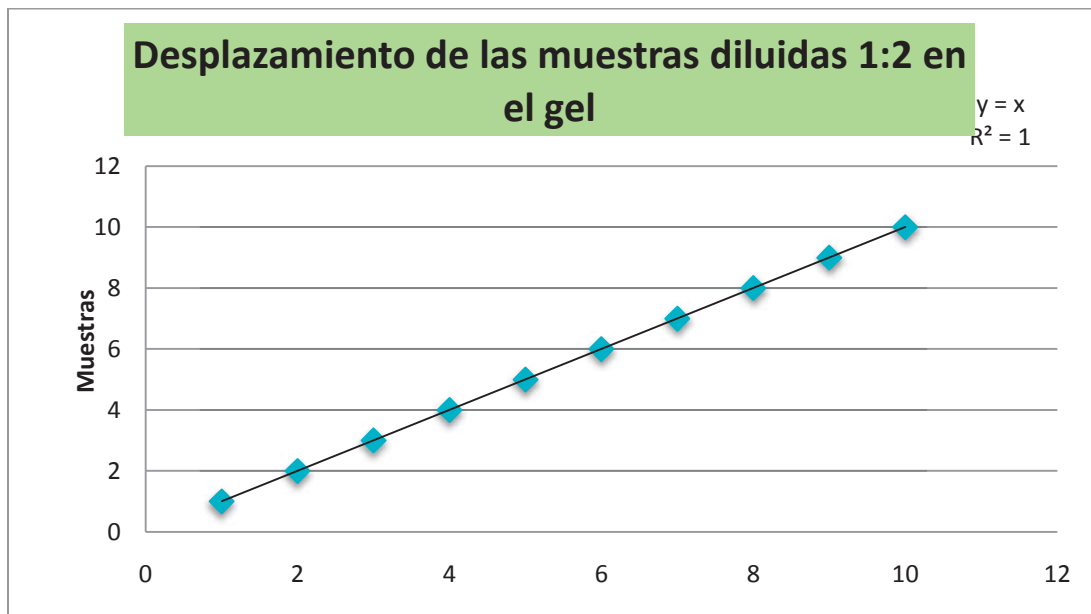
Las gráficas 7: a), b) y c) muestran por partes la gráfica 8 (exponencial) para comprobar que el coeficiente de correlación de Pearson sigue siendo 1 o se aproxima a este, lo que indica que sigue habiendo una linealidad en el comportamiento de la concentración de la proteína p30 en relación a la dilución a la cual se encuentre la muestra.

En la tabla 13, se muestra el desplazamiento en el gel de agarosa al realizar la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para esta proteína, que tuvo cada una de las muestras a las diferentes diluciones, así como la desviación estándar obtenida de las diluciones.

TABLA 13 Relación del corrimiento en la inmunoelectroforesis para la p30 a diferentes diluciones

Muestra	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1	2.3 cm	2.4 cm	2.0 cm	1.8 cm	1.7 cm	1.7 cm	1.2 cm	0 cm
2	2.5 cm	2.2 cm	2.1 cm	1.8 cm	1.8 cm	1.7 cm	1.3 cm	0 cm
3	2.5 cm	2.4 cm	2.3 cm	2.0 cm	1.8 cm	1.5 cm	1.4 cm	0 cm
4	2.5 cm	2.3 cm	2.1 cm	2.0 cm	1.7 cm	1.6 cm	1.3 cm	0 cm
5	2.3 cm	2.3 cm	2.1 cm	2.0 cm	1.6 cm	1.6 cm	1.4 cm	0 cm
6	2.6 cm	2.3 cm	2.1 cm	1.9 cm	1.7 cm	1.4 cm	1.3 cm	0 cm
7	2.5 cm	2.4 cm	2.1 cm	1.9 cm	1.8 cm	1.4 cm	1.3 cm	0 cm
8	2.5 cm	2.2 cm	2.3 cm	1.9 cm	1.7 cm	1.5 cm	1.3 cm	0 cm
9	2.6 cm	2.2 cm	2.0 cm	1.9 cm	1.7 cm	1.5 cm	1.3 cm	0 cm
10	2.8 cm	2.4 cm	2.1 cm	2.0 cm	1.8 cm	1.4 cm	1.4 cm	0 cm
SD	0.145	0.088	0.103	0.079	0.067	0.116	0.063	0

Se observa en la gráfica 8 , el comportamiento lineal del desplazamiento de la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:2. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



GRÁFICA 8 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:2

En la gráfica 9 se observa el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:4. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



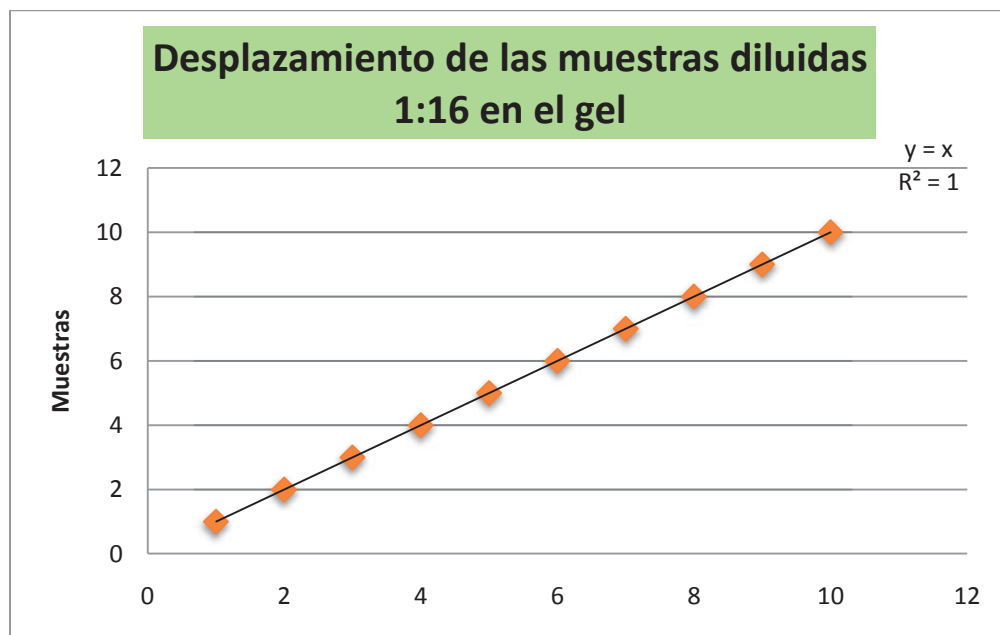
GRÁFICA 9 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:4

Se observa en la gráfica 10, el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:8. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



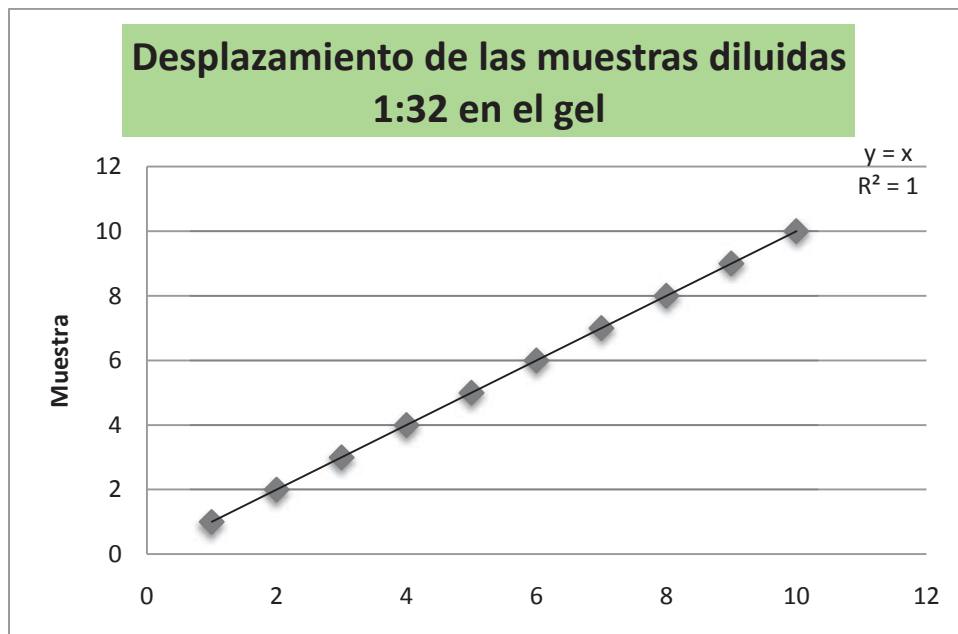
GRÁFICA 10 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:8

Se observa en la gráfica 11, el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:16. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



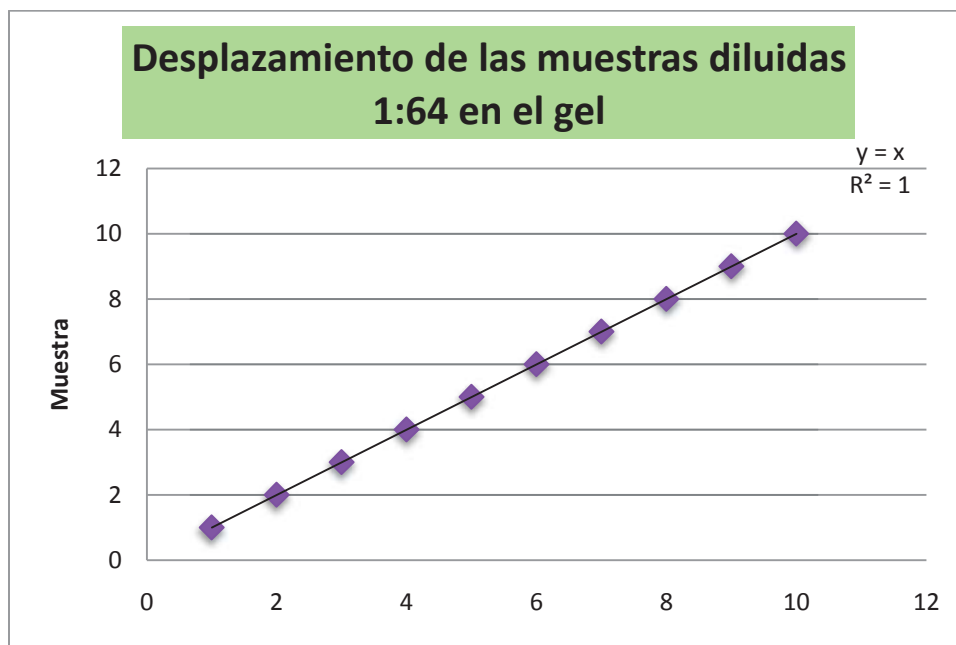
GRÁFICA 11 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:16

En la gráfica 12 se observa el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:32. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



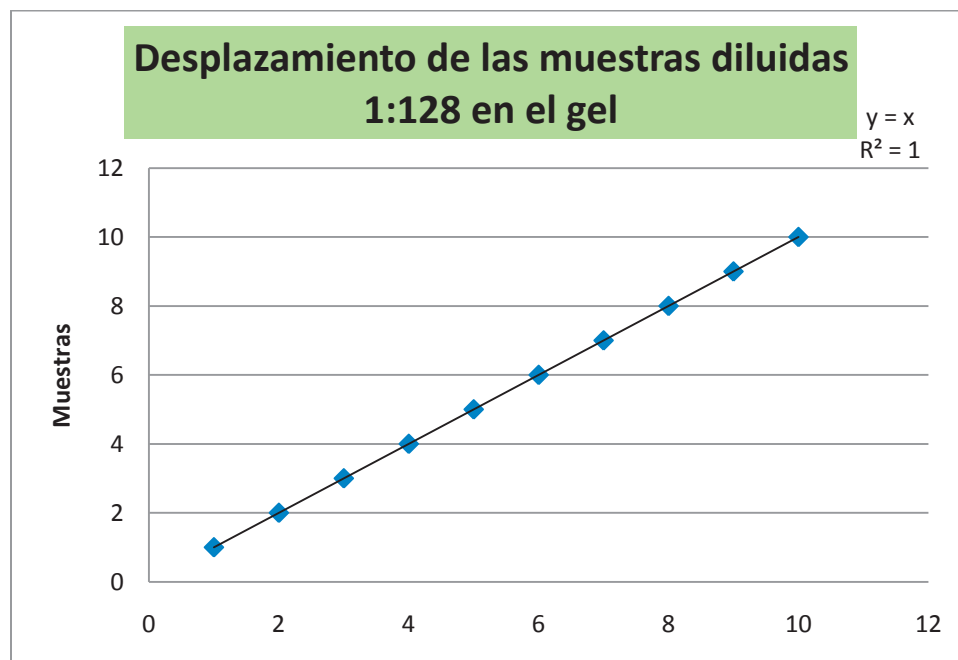
GRÁFICA 12 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:32

Se observa en la gráfica 13, el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:64. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



GRÁFICA 13 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:64

Se observa en la grafica 14, el comportamiento lineal del desplazamiento la proteína p30 presente en las muestras de semen diluidas 1:128. Se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es igual a 1 lo que indica que hay una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 presente en la muestra y el desplazamiento de la misma en el gel de la inmunoelectroforesis de cohete convencional modificada para p30.



GRÁFICA 14 Desplazamiento de la proteína p30 en el gel a dilución 1:128

Una vez obtenidos nuestros resultados y ser analizados, con la ayuda de gráficas y estadísticos de prueba para comprobar si las muestras son independientes, o el índice de concordancia que se tiene entre los métodos; apegándonos a lo establecido en las guías para validación de métodos o ensayos en este caso la guía EURACHEM, podemos determinar si cada una de nuestras técnicas desarrolladas en el Laboratorio de Química Forense del la PGJE de Michoacán cumplen con los requerimientos específicos para los cuales son utilizadas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La validación es requerida en las normas que hablan sobre la calidad en los sistemas de gestión, entre esas normas se encuentra la norma ISO 17025 y la norma ISO 15189. La validación del método es un requisito para la acreditación de un laboratorio, la acreditación no es más que la atestación que realiza un organismo de certificación, en este caso la ema, a un organismo de evaluación de la conformidad, manifestando la demostración formal de la competencia del laboratorio al que se evalúa para llevar a cabo tareas específicas de evaluación de la conformidad; la validación se realiza por medio de pruebas objetivas que demuestran la capacidad del método para cumplir con los requerimientos a los cuales se aplica.

La validación de los métodos es el proceso de establecer el desempeño que tiene, así como sus limitaciones e influencias; es decir la validación nos ayuda a verificar que el método es apropiado para el requisito previsto. La validación se hace necesaria cuando el método permite ciertas libertades al que lo realiza, tales que el resultado del método pueda variar en su resultado significativamente debido a ellas.

En nuestro estudio la validación se vuelve indispensable para asegurar que las tres técnicas utilizadas satisfacen los requisitos para los cuales son aplicadas, para ello se expresó el fundamento de cada una de las técnicas, la función específica que cumplen y la aplicación para la cual son utilizadas.

En esta tesis evaluamos 3 técnicas: la fosfatasa ácida, para la determinación de esta enzima en las muestras que contenían líquido seminal, la visualización de células espermáticas por medio de la tinción de Christmas Tree en líquido seminal y determinación de la proteína p30; esto con la finalidad de evaluar el desempeño de las mismas y determinar si cumplen con los requerimientos establecidos en las guías de validación y las normas anteriormente descritas, para la evaluación por parte del organismo de acreditación y así determinar si el método queda o no

validado, es decir que si cumple con los requerimientos específicos para los cuales es aplicado.

El objetivo de este estudio es medir el desempeño de las técnicas utilizadas en el análisis espermatoológico como la presencia de la enzima fosfatasa acida, la proteína p30 y tinción de espermatozoides por la tinción de Christmas Tree en muestras de exudado vaginal y liquido seminal; esto, para llevar a cabo la validación total de cada una de las técnicas anteriormente mencionadas, para comprobar y confirmar con evidencia documentada, que las técnicas cumplen y se desarrollan dentro de los intervalos definidos por las guías de validación.

Los resultados obtenidos de cada una de las técnicas nos llevo a las siguientes conclusiones:

- La técnica utilizada para la determinación de la enzima fosfatasa ácida en el Laboratorio de Química Forense de la PGJE, presenta una sensibilidad de 90.24%, una especificidad del 100%, valores que se encuentran dentro de los rangos expresados en las guías de validación.
- Se determinó que la fosfatasa ácida es detectable por los reactivos de esta técnica en diluciones de 1:4096 en concentraciones de 0.61 UKA, aunque en menores concentraciones la enzima presente en la muestra tarda aproximadamente 5 min en reaccionar con los reactivos que se utilizan para esta técnica. Transcurrido este tiempo ya no reacciona.
- Se determinó que la concentración de fosfatasa ácida presente en la muestra, presenta una correlación lineal con respecto a la dilución a la que se encuentre.
- La fosfatasa presente en muestras poco diluidas reacciona al instante con los reactivos permaneciendo la coloración, conforme disminuye la concentración de fosfatasa ácida, esta tarda más tiempo en reaccionar con los reactivos, es decir la reacción ocurre más lento por lo que lleva más tiempo, habiendo concentraciones tan mínimas de fosfatasa ácida estas ya no reaccionan por ser tan escasa la presencia de la enzima.

- La visualización de las células espermáticas por medio de la tinción de Christmas Tree, fue la determinación de ausencia o presencia de células espermáticas en las muestras, para ello se utilizaron muestras de líquido seminal que si contenían células. A esta técnica se le aplicó la repetitibilidad del resultado, al ser leídas en el microscopio las mismas muestras por diferentes Químicos y un experto forense, la repetitibilidad fue de un 100% ya que todos obtuvieron los mismos resultados. Esta técnica es confirmatoria para espermatozoides.
- La técnica utilizada para la determinación de la proteína p30 en el Laboratorio de Química Forense de la PGJE por medio de la técnica de inmunolectroforesis de cohete convencional modificada para la proteína p30, presenta una sensibilidad de 100%, una especificidad del 100% valores excelentes que se encuentran dentro de los rangos expresados en las guías de validación. La corroboración de los resultados obtenidos por la técnica inmunocromatográfica dio un grado de concordancia muy bueno al obtener los mismos resultados por ambas técnicas. La determinación de este mensurando en la muestra que se analiza es mucho más específica que la fosfatasa ácida y la visualización de células espermáticas, es de gran utilidad cuando la muestra proviene de una agresión sexual donde el agresor es azoospermico o vasectomizado.
- El límite de detección de la proteína p30 por la técnica de inmunolectroforesis es una concentración de 1.562 ng/ μ L en muestras de semen diluidas hasta 1:128
- La concentración de la proteína p30 con respecto a la dilución de la muestra, presenta un comportamiento exponencial, con una fuerte asociación lineal.
- Se concluye que a mayor concentración de la proteína p30 presente en la muestra mayor va ser el desplazamiento en el gel de la electroforesis y viceversa a menor concentración de la proteína p30 o mayor dilución de la muestra menor será el corrimiento en el gel de la misma.

- El desplazamiento en el gel tiene un comportamiento lineal en muestras que presentan la misma concentración de la proteína p30, teniendo también una fuerte asociación lineal positiva entre la concentración de la proteína p30 y el desplazamiento en el gel.
- Por la naturaleza de la muestra que se necesita para realizar cada uno de los métodos, el parámetro de repetibilidad queda limitado para una sola ocasión ya que la cantidad de las muestras son insuficientes para estar determinando periódicamente los resultados, además de que la muestra se degrada al paso del tiempo y es considerada única e irrepetible.
- La determinación de la incertidumbre del método en este tipo de métodos no cuantitativos resulta ser muy complicado y tedioso, además que el organismo de acreditación no lo exige al tratarse de esta naturaleza de métodos, por ello no es obligatorio realizarlo.

Llegando a la conclusión final de que nuestra hipótesis planteada sobre las técnicas espermáticas: fosfatasa acida, inmunolectroforesis de proteína p30 y Tinción Christmas Tree, utilizadas para la determinación cualitativa de la enzima fosfatasa ácida, la proteína p30 y espermatozoides presentes en el flujo seminal tienen un buen desempeño consistente, en el laboratorio de química forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado es cierta y se cumple de manera concisa y eficazmente por medio de la validación de los métodos.

La validación de las concentraciones de las técnicas utilizadas, así como incorporar la prueba de calidad entre Químicos y en la información sobre la muestra, sería un complemento a este trabajo ya que serviría para el control de calidad; así mismo sería de gran utilidad incorporar más resultados al estudio realizado y en diferentes y más soportes, esto con el fin de de obtener mayor robustez en los resultados; esto como un trabajo a futuro para mejorar el desempeño de las técnicas.

ANEXO A

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA INMUNOELECTROFORESIS DE COHETE CONVENCIONAL MODIFICADA PARA PROTEÍNA p30

PREPARACION DE SOLUCION SALINA AL 0.85%

1. Pesar 8.5g de NaCl
2. Colocarlos en un matraz volumétrico de 1L y disolver con poca agua destilada
3. Homogenizar y aforar hasta la marca de aforo
4. Homogenizar y almacenar en un frasco bien cerrado, en un lugar seco.

PREPARACION AGAROSA AL 1%

1. Pesar 1g del polvo gel agarosa
2. Disolver el polvo con 100 mL de agua destilada mediante calentamiento de 2-3 min puede utilizarse el microondas, pero hay que tener precaución ya el gel es muy caliente y puede provocar quemaduras serias.

AMORTIGUADOR TBE 10X pH 9.1 preparación para 1L

1. Pesar 108g de Tris Base
2. Medir en probeta graduada 40mL de EDTA 0.5M , pH 8
3. Pesar Acido Bórico 55g
4. Se agregan uno a uno los reactivos anteriores a 500 mL de agua destilada en un matraz volumétrico y se homogeniza la solución el pH se ajusta a 9.1 con NaCl.
5. Se afora a 1L y se almacena, en un frasco bien cerrado y en un lugar seco.

Nota: Preparación de EDTA 0,5 M: Se pesan 1,97 g de EDTA trisódica y se disuelven en 10 mL de agua destilada. Se disuelve muy mal, por lo que se utiliza el agitador magnético a una temperatura elevada. Se tapa el vaso de precipitados para que no se evapore. Se conservará en un tubo Falcon. Al cabo del tiempo vuelve a precipitar.

COLORANTE AZUL DE COOMASSIE 1%

1. Pesar 1 g Azul Brillante Coomassie R-250
2. Medir 450 mL etanol en una probeta graduada
3. Medir 100 mL ácido acético glacial en una probeta graduada
4. En un vaso de precipitados disolver el azul brillante de Coomassie con el etanol y el ácido acético.
5. Pasar la mezcla a un matraz volumétrico de 1L
6. Aforar a 1 L con agua bidestilada
7. Mantener en agitación hasta la disolución de la mayor parte de colorante.
8. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente en botellas de color ámbar.

DECOLORANTE I

(40% metanol, 7 % ácido acético y 53% de agua destilada)

1. Medir 40 mL de metanol en una probeta graduada
2. Medir 7 mL de ácido acético en una probeta graduada
3. Verter el metanol y el ácido acético en un matraz volumétrico de 100 mL, homogenizar suavemente.
4. Aforar con 53 mL de agua destilada hasta marca de aforo, homogenizar y almacenar en un frasco cerrado

DECOLORANTE II

(20% metanol, 20% ácido acético y 60% de agua destilada)

1. Medir 20 mL de metanol en una probeta graduada
2. Medir 20 mL de ácido acético en una probeta graduada
3. Verter el metanol y el ácido acético en un matraz volumétrico de 100 mL, homogenizar suavemente.
4. Aforar con 60 mL de agua destilada hasta marca de aforo, homogenizar y almacenar en un frasco cerrado

ANEXO B

ESTADÍSTICOS DE PRUEBA

A) TABLAS DE CONTINGENCIA 2 X 2

Analizar la distribución de una variable con relación a otra u otras es la búsqueda de un patrón que indique la relación, (o la falta de ella) entre las variables estudiadas.

El estudio de la influencia de una variable (variable independiente) sobre la forma en que se modifica otra (variable dependiente) es conocido como análisis bivariado; y será multivariado cuando el estudio evalúe de forma simultánea el efecto sobre una variable dependiente de dos o más variables independientes.

Las tablas de contingencia (tablas de doble entrada) son una herramienta fundamental para este tipo de análisis. Están compuestas por filas (horizontales), para la información de una variable y columnas (verticales) para la información de otra variable. Estas filas (h) y columnas (k) delimitan *cel/das* donde se vuelcan las frecuencias de cada combinación de las variables analizadas. En su expresión más elemental, las tablas tienen solo 2 filas y 2 columnas (tablas de 2x2) un ejemplo de su estructura sería:

Tabla B.1 Modo de estructurar una tabla de contingencia 2 x 2

	Presencia de mensurando	Ausencia de mensurando	TOTAL
RESULTADO POSITIVO	a	B	a +b
RESULTADO NEGATIVO	c	D	c +d
TOTAL	a + c	b +d	n

En la tabla de contingencia el valor de la sensibilidad se calcula $a / (a + c)$ y el valor de la especificidad es $d / (b + d)$; también con este tipo de tabla se calcula el valor predictivo positivo (VPP): $a / (a + b)$ y el valor predictivo negativo (VPN): $d / (c + d)$.

Los modelos estadísticos propuestos para analizar este tipo de tablas son tres: el test de la Chi-cuadrado, el G-test y el test exacto de Fisher. Para evaluar la tabla de contingencia se puede hacer por medio de χ^2 . En el caso de la tabla de contingencia 2x2, el valor de χ^2 se puede calcular mediante el método abreviado con la fórmula siguiente:

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2}{n \cdot \frac{a+b}{n} \cdot \frac{c+d}{n} \cdot \frac{a+c}{n} \cdot \frac{b+d}{n}}$$

Ecuación B1

Donde a, b, c, d son las frecuencias de células observó como se muestra en la tabla. Cuando se aplica la (n-1) (k-1) regla para encontrar los grados de libertad de tabla de contingencia 2x2, el resultado es un grado de libertad. El valor de χ^2 calculado se compara con el valor tabulado de una χ^2 para un nivel de confianza determinado y (n-1) (k-1) grados de libertad. Si el valor calculado es mayor que el valor de tablas de una χ^2 , significará que las diferencias entre las frecuencias observadas y las frecuencias teóricas o esperadas son muy elevadas y por tanto diremos con un determinado nivel de confianza que existe dependencia entre los factores o atributos analizados.

Resumiendo:

- > Rechazar hipótesis nula (dependencia entre las variables)
- < Aceptar hipótesis nula (independencia entre las variables)

Para cuando tenemos frecuencias pequeñas: los problemas de cómo manejar pequeñas frecuencias previstos y pequeños tamaños de la muestra total puede un sí en el análisis de tablas de contingencia 2x2. Cochran sugiere que la prueba de χ^2 no debe utilizarse en caso de $n < 20$ de $20 < n < 40$ y una frecuencia esperada es menor que lo es.

Ejemplo del uso de tablas de contingencia 2x2:

De acuerdo con Silver y Aiello (A-4), las caídas son de gran preocupación entre los supervivientes de la polio. Los investigadores querían determinar el impacto de una caída en el cambio de estilo de vida. La tabla muestra los resultados de un estudio de 233 supervivientes de la polio si el temor de caer como resultado cambios de estilo de vida.

Solución:

1. Datos: a partir de la información dada podemos construir la tabla de contingencia 2x2 que aparecen.
2. Suponemos que la muestra es equivalente a una muestra aleatoria de la muestra.
3. Las hipótesis:
Ho. Caída situación y el cambio de estilo de vida por temor de caer son independientes.
H1. Las dos variables no son independientes que $\alpha = .05$

Tabla B.2 Ejemplo tabla de contingencia 2 x2

A realizado cambios en el estilo de vida debido al miedo de caer			
	SI	NO	
Sufren caídas	131	52	183
No sufren caídas	41	36	50
TOTAL	145	88	233

Source: J.K. Silver and D. D. Aiello "Polio survivors: Falls and subsequent injuries" *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 81 (2002), 562-575

4. Test estadístico es: _____ que es lo mismo que la ecuación B1.
5. Distribución de la estadística de prueba. Cuando Ho es verdadera, se distribuye aproximadamente como _____ con $(n-1)(k-1) = (2-1)(2-1) = 1$ grado de libertad, para ello vemos en las tablas del estadístico _____.
6. Regla de decisión. Rechazar Ho si el valor calculado de χ^2 es igual, o superior a 3.841
7. Calculando el test estadístico con la ecuación B1:
- 8.- Rechazamos Ho porque $31.7391 > 3.841$

9. Conclusión Llegamos a la conclusión de que H_0 es falsa, y que existe una relación entre la presencia de una caída y el cambio de estilo de vida de uno por el temor de caer. [33]

B) ANALISIS DE CONCORDANCIA (INDICE KAPPA)

En cualquier estudio de investigación una cuestión clave es la fiabilidad de los procedimientos de medida empleados. Dos aspectos distintos entran a formar parte típicamente del estudio de fiabilidad: de una parte, el sesgo la tendencia de un observador a dar consistentemente valores mayores que otro y , la concordancia entre observadores –es decir, hasta qué punto los observadores coinciden en su medición.

Ahora se trata de medir el grado de acuerdo entre varios métodos o evaluadores que clasifican el resultado de una observación según una serie de posibilidades (categorías) mutuamente excluyentes. El caso más sencillo se presenta cuando la variable cualitativa es dicotómica (dos posibilidades) y se está comparando dos métodos de clasificación (por ejemplo dos escalas clínicas). Esta situación se puede representar en una tabla B.3 de frecuencias.

Tabla B.3 tabla de frecuencias para análisis de concordancia

Método B				
Método A		Positivo	Negativo	
	Positivo	a	C	f1
	Negativo	b	D	f2
		c1	c2	N

La medida más simple de concordancia es la proporción de coincidencias frente al total de sujetos:

ecuación B2

Pero resulta que aunque no existiera ninguna relación entre los dos métodos de clasificación, está claro que es previsible que encontremos algún grado de concordancia entre ellos por puro azar. Así, si el método A consiste en clasificar al

paciente con resultado positivo si sale cara al lanzar una moneda al aire y cruz en el caso contrario, y hacemos lo mismo en el método B (con otra moneda diferente), es previsible encontrar en promedio del orden de un 50 % de coincidencias.

Supongamos que el sistema A es un método científico de diagnóstico y el método B es la opinión de un "vidente"; también ahora es previsible encontrar un cierto grado de concordancia debido en parte al azar.

Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar, se define el índice de concordancia kappa de la siguiente manera:

Ecuación B3

Donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $1-P_e$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De ese margen nosotros observamos probablemente sólo una parte P_o-P_e , salvo que haya acuerdo perfecto $P_o=1$.

Así pues en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es 1; si la concordancia observada es igual a la esperada kappa vale 0; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado el índice kappa es menor que cero.

Para calcular P_e , la concordancia esperada, el razonamiento es el siguiente: de acuerdo con la tabla anterior la probabilidad de que el método A clasifique a un sujeto como positivo podemos estimarla como f_1/n ; mientras que la correspondiente probabilidad del método B la estimaremos como c_1/n . Si consideramos que existe independencia entre ambos métodos de clasificación, la probabilidad de que coincidan clasificando al mismo sujeto como positivo será entonces el producto de las dos probabilidades (sucesos independientes). Aplicando el mismo razonamiento calculamos la probabilidad de que se produzca acuerdo entre los métodos al clasificar a un sujeto como negativo, y entonces la

probabilidad de acuerdo cualquiera de las dos clasificaciones será la suma de ambos valores, esto es:

Ecuación B4

El coeficiente kappa fue propuesto originalmente por Cohen (1960) para el caso de dos evaluadores o dos métodos, por lo que a menudo se le conoce como kappa de Cohen, y fue generalizado para el caso de más de dos evaluadores por Fleiss, por lo que a veces también se habla del índice kappa de Fleiss.

Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	muy bueno

Este índice se puede generalizar para clasificaciones multinomiales (más de dos categorías) y para más de dos evaluadores, siendo similar su interpretación. [47]

Ejemplo [48]: Se quiere valorar la concordancia entre dos investigadores en el diagnóstico de una enfermedad para la cual se estudian 100 pacientes, obteniéndose los siguientes resultados:

OBSERVADOR 2				
OBSERVADOR		Sano	Enfermo	
1	Sano	46	10	56
	Enfermo	12	32	44
		58	42	100

El porcentaje de concordancia esperada por zar se obtiene de la siguiente tabla:

OBSERVADOR 2				
OBSERVADOR 1		Sano	Enfermo	
	Sano	58% de 56=32,5	42% de 56= 23,5	56
	Enfermo	58% de 44=25,5	42% de 44=18,5	44
	total	58/100=58%	42/100= 42%	100

Acuerdo real más allá del zar

Acuerdo potencial no atribuible al del azar

Índice Kappa: —

REFERENCIAS

1. Ulloa Ziarriz T, R.T.C., Olamendi TP. , *Papel de los órganos de impartición de justicia frente a la violencia intrafamiliar*. Unifem, México D.F., 1996(Memorias del Encuentro Continental sobre Violencia Familiar.).
2. Guzmán, C.A., *Manual de Criminalística*. reimpresión ed. 2000, Buenos Aires Rocca. 618.
3. Gabriel Mayoral Andrade, E.P.C., Lucía Martínez Martínez, Pedro Hernández Cruz “*identificación forense del fluido seminal*”. LAB 2006: . 18 p. 43-6.
4. Martha, F.d.A., *Hematología Forense y otras Técnicas Serológicas*. Porrúa, ed. t. edición. 2009.
5. Beatriz Gel Iglesias, B.G.I., Meritxell López, Ana, *Bases de la fisiología*. Editorial Tebar 2007, ed. 2. 2007. 623.
6. Finn, G., *Histología*. panamericana, ed. tercera. 2008.
7. Cindy W. Christian, J.M.L., Allan R. De Jong, John Loiselle, Lewis Brener Mark Joffe, *Forensic Evidence Findings in Prepubertal Victims of Sexual Assault*, in *Pediatrics*. 2000. p. 106.
8. Prieto Ruiz , V. (2004) “*El estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de Biología*”. Canela.
9. Justice, U.S.D.o., *Handbook of Forensic Science*, ed. F.B.o. Investigation. 1994, Washington D.C.: Federal Bureau of Investigation. 50-51.
10. A.Guzmán, C., *Manual de Criminalística*. reimpresión ed. Editorial Roca, ed. r.E. 1997. 2000, Buenos Aires Argentina.
11. Gisbert Calabuig, E.V.C., *Medicina legal y toxicología*. ,6ta ed. Elsevier ed. Masson. 2004, España.
12. Nadia Khaldi, A.M., Koffi Botti, Larbi Benali, Sophi Grambo, *Evaluation of Tree Rapid Detection Methods for the Forensic Identificación Of Seminal Fluid In Rape Cases*. Forensic SCI 2004. **49**: p. 1-5.
13. in *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 1997, Octubre-Diciembre p. 75.
14. Manfred N. Hochmeister, B.B., Oskar Rudin, Christian Gehrig, and M.T. Urs Borer, Richard Dirnhofer, *Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid*, in *J Forensic Sci*. 1999. p. 1057–1060.
15. SATO I, S., ISHIWARI A, H, N., E, I. & T, M., *Use of the “SMITEST” PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine in Forensic Science International*. 2002. p. 71-74.
16. Al, S.E., *Use of the „SMITEST” PSA card to identify the presence of prostate –specific antigen in semen and male urine*. Forensic SCI, 2002. **Int 127**: p. 71-74.
17. SEMIQUANT, I.S.P., *Test de diagnóstico in vitro de uso profesional forense para la detección de fluido seminal mediante la determinación semicuantitativa de PSA (Antígeno próstata específico)* in *Art.-Nr.PSM400F*, SERATEC, Editor. 2008, www.seratec.com. p. 5.
18. Castieiras Lacambra M.J., F.A.X., Queralto Compañó J.M., *Bioquímica clínica y patología molecular, Volumen 1*. Edición 2da ed. Reverté, ed.

- F.A.X. Castieiras Lacambra M.J., Queraltó Compañó J.M. Vol. Vol. 1. 1997. 600.
19. J., W.M., *The Protein Protocols Handbook*, in *Rocket Immuno-electrophoresis* 1997: Totowa, NJ. p. 757-762.
 20. R, W., *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. 4ta. Ed ed. WILEY-VCH ed. V.G.C. KGaA. 2005, Alemania.
 21. E, D.L.C.A.B.T.L.M.D.M.E., “El papel de la sección de Bioquímica de la Investigación por agresión sexual en Costa Rica”. *Revista Judicial*. **84**.
 22. García Ballejo, M.J., *Temario materias específicas: Técnico Especialista en Anatomía in MAD*. 2006: México. p. 39-40.
 23. Kuhnel, W., *Atlas de Citología e Histología*. panamericana. 2005.
 24. IMNC, *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*, in *NMX-EC-17025-IMNC-2006*. 2006. p. 32.
 25. IMNC, *laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la competencia*, in *NMX-EC-15189-IMNC-2008* 2008.
 26. Chemistry, I.U.o.P.a.A., *Compendium of Analytical Nomenclature*, in *Book Orange*, T.L. János Inezedy, Allan M. Ure, Editor. 1997, IUPAC.
 27. Ruisánchez Itziar, T.E.y.F.X.R., “Validación de Métodos Analíticos Cualitativos”, *Grupo de Quimiometría y Cualimetría, Técnicas de laboratorio*. 2003, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universidad de Rovira Rovira. p. 328-335.
 28. Sánchez Ruiz Juan Francisco , T.R.M.E., Wolfhard Koch,, M.S.R. Mora Guevara José Luis Alfredo , Vicente Hernández Abad,, and S.G.E.G. Islas Pérez Valentín , De León Valdez Alfredo, *Validación de métodos analíticos no cuantitativos*, in *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 2010: Mexico. p. 10.
 29. Cervantes, Q.J.I.U. *Una propuesta de solución a la problemática de la trazabilidad en las Mediciones Ambientales bajo la óptica de la NMX EC 17025 IMNC 2000*. Laboratorios ABC Química Investigación y Análisis S.A. de C.V. 2010 [cited 2010 www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/.../doctos/te087.pdf].
 30. N.Taylor, B., *Guide for the Use of The International System of Units (SI)*, in *NIST*. 1995, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg. p. 83.
 31. UERACHEM, *Métodos Analíticos Adecuados a su propósito Guía de Laboratorio para la validación de Métodos y temas relacionados* 2da ed. CMN-MRD-PT030, ed. P. Técnica. 2005, Qro. Mexico: Primera Edición 1998.
 32. Gutiérrez, R.J.L.M.e.I.H., “la Validación de Métodos: Un enfoque Práctico” in *Simposio de metrología del 25 al 27 de Octubre 2004*. 2004, CENAM: Qro. México. p. 10.
 33. W.W.Daniel, *Biestadística base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa Wiley 2002, Georgia: Universidad del estado de Georgia. 912.
 34. S. Berg, D., Z., *Ges Gerichthl*, ed. Med. 1954/ 42.

35. Cifuentes Sandra Liliana, V.P.P. (2010) *Validación del método de detección de antígeno prostático específico (PSA), por inmunocromatografía (Organics) aplicado a líquido seminal presente en manchas secas y escobillones*. Medicina Legal, Colombia Forense **20**, 24-28.
36. Delgado Peña Eliana, B.T.V., *Validación de una técnica inmunocromatográfica para la detección de sangre humana en manchas de interés forense en el laboratorio de biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Regional Bogotá, empleando el kit RapiSignal Occult Blood. Cassette de la firma Orgenics, in laboratorio de biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Regional Bogota*. 2006, Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá. p. 181.
37. López, M.d.l.R. (2007) *Introducción a la Bioética. Metodología para tomar decisiones en Ética Clínica*. Pediatr Integral **11**, 863-877.
38. Gracia Guillén, D., *Como arqueros al blanco: estudios de bioética*, ed. Triacastela. Vol. 11 de Humanidades Medicas. 2004, Madrid España. 516.
39. Diario Oficial de la Federación, *NOM-087-ECOL-SSA1-2002; Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*, C.F.p.l.P.c.R. Sanitarios, Editor. 2002, 1 de noviembre del 2001: Diario Oficial de la Federación.
40. Diario oficial de la federación, *LEY GENERAL DE SALUD*, D.O.d.l. Federación, Editor. 2009, DOF 11-06-2009: 7 febrero del 1984.
41. Diario Oficial del Estado, C.d.M.d.O., *CÓDIGO PENAL DEL ESTADO DE MICHOACÁN*, d.O.d. 2007, Editor. 2007, Diario Oficial
42. Diario Oficial del Estado, H.C.d.E.d.M.d.O., *CODIGO DE PROCEDIMIENTOS PENALES DEL ESTADO DE MICHOACAN*, d.m.d. 2009, Editor. 2009, Periodico Oficial: Michoacan de Ocampo. p. 121.
43. Diario Oficial del Estado, H.C.d.e.d.M.d.O., *LEY ORGÁNICA DE LA PROCURADURÍA GENERAL DE JUSTICIA DEL ESTADO*. 2007, 31 de Agosto de 1998: Periódico Oficial del Estado. p. 18.
44. Diario Oficial de la Federación, *Norma Oficial Mexicana NOM-114-STPS-1994, Sistema para la Identificación y Comunicación de Riegos por Sustancias Químicas en los Centros de Trabajo*. 1994. p. 26.
45. Diario Oficial de la Federación, *NORMA Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo*. 2008: p. 11.
46. Escobedo Zavala , B.R., *IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA p30, MEDIANTE LA MODIFICACIÓN Y LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOELECTROFORESIS DE COHETE CONVENCIONAL, EN LA INVESTIGACIÓN PERICIAL*, in *CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y FARMACÉUTICAS*. 2010, Autónoma de Nayarit: Morelia Michoacán. p. 98.
47. Molinero, L.M. *Medidas de Concordancia para Variables cualitativas*. Diciembre 2001 [cited 23 de Nov 2010].
48. Torre, A., *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*. 2002: Glosa.