

Efecto del Bluestar forensics® sobre las pruebas preliminares y de análisis de ADN en la investigación de manchas de sangre

Effects of forensics Bluestar® on DNA preliminary tests and analysis in bloodstain investigation

- ¹ Eliana Giraldo V.
² Tatiana Espinosa M.
³ Nataly Lezcano M.
⁴ Daniel Zuluaga B.
⁵ Yolanda Clavijo B.
⁶ Tatiana Herrera E.
⁷ Karina Valencia A.

Resumen

La sangre en el contexto forense es un tipo de indicio fácilmente reconocible sobre soportes como paredes, pisos, armas, prendas, etc. Por esto las manchas encontradas en la escena del crimen se han constituido como elemento esencial en la solución de investigaciones judiciales. Es vital determinar su origen mediante técnicas confiables como las pruebas presuntivas en escena, confirmación y análisis de ADN, con el fin de proporcionar información a las autoridades competentes para la resolución de las investigaciones.

-
- ¹ Magíster en Epidemiología, docente de cátedra del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. Profesional especializada, forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. leligiraldo@medicinalegal.gov.co.
² Ingeniera Bióloga, docente de cátedra del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. tatyepy21@hotmail.com.
³ Estudiante de Profesional en Criminalística del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. nathi.lz@hotmail.com.
⁴ Estudiante de Profesional en Criminalística del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. danielzuluaga90@hotmail.com.
⁵ Técnico en producción y video, técnico forense del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses. yclavijo@medicinalegal.gov.co.
⁶ Tecnóloga en Investigación Judicial del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. taty.heres@hotmail.com.
⁷ Tecnóloga en Investigación Judicial del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. kary1017@hotmail.com.



Se evaluó el comportamiento de las pruebas presuntivas (Thevenon y Roland), de confirmación (sangre humana) y análisis de ADN (cuantificación), para manchas de sangre en escena una vez la muestra se sometió a agentes químicos como Bluestar forensics®. Se analizaron muestras de sangre en diferentes soportes, y a diferentes diluciones con el fin de determinar la mínima cantidad de muestra detectable en las pruebas presuntivas, de confirmación y análisis de ADN.

Los resultados de las pruebas presuntivas y de confirmación para las muestras tratadas y no tratadas con Bluestar forensics® se comportaron de igual forma, lo que demuestra que no se afectan. Se recuperó ADN para las manchas de sangre que habían sido reveladas con el agente quimioluminiscente, lo que indica que no degrada el ADN. Se halló mayor sensibilidad para las pruebas de Thevenon y Roland y sangre humana, que para el Bluestar forensics® y el análisis de ADN.

Palabras clave: *Pruebas inmunocromatográficas, pruebas presuntivas, DNA, manchas de sangre, Bluestar forensics®.*

Abstract

In the forensic field, blood is an easily recognizable sign on surfaces such as walls, floors, weapons, clothes, etc. So stains found at a crime scene have become an essential element in solving criminal investigations. It is vital to determine its origin through reliable techniques such as presumptive tests at the scene, DNA analysis and confirmation, in order to provide information to competent authorities for inquiry resolution. In this paper, the behavior of Thevenon and Roland presumptive tests, as well as DNA confirmation (human blood) and analysis (quantification) for bloodstains at the scene was assessed once the sample was subjected to chemical agents, like Bluestar®. Blood samples on different media and at different dilution degrees were analyzed in order to determine the minimum detectable amount of sample in presumptive tests, and DNA confirmation and analysis.

Results of presumptive and confirmation tests for Bluestar forensics®-treated and untreated samples behaved similarly, which proved they are not affected by the chemical compound. DNA was recovered from bloodstains that were exposed by the chemiluminescent agent, which prove it does not degrade DNA. Higher sensitivity was found in Thevenon and Roland tests and human blood than that of Bluestar forensics® and DNA analysis.



Keywords: *Immunochromatographic tests, presumptive tests, DNA, blood stains, Bluestar forensics®.*

Introducción

Durante el desarrollo de la investigación de un hecho en el que hay elementos que indican que puede existir una conducta delictiva, el investigador se enfrenta el análisis de indicios biológicos importantes para determinar la existencia y la dinámica del delito, incluso afronta escenas donde los involucrados borran los indicios resultado de su conducta^{1,2} lo que genera la pérdida de los elementos prácticos que permiten desarrollar una teoría frente a la investigación.

Los tipos de fluidos biológicos más comúnmente estudiados en los lugares del hecho son los restos de sangre, semen, fluidos vaginales, saliva y pelos, que se presentan sobre una amplia variedad de soportes; casi todos tienen en común ser escasos, estar degradados o contaminados, mezclados con otros fluidos o con sustancias contenidas en el soporte³⁻⁵.

En la mayoría de las escenas donde se presentan situaciones violentas, la investigación de manchas de sangre es importante para lograr el esclarecimiento del hecho⁶⁻⁸ en estas condiciones, es fundamental que los investigadores cuenten con el conocimiento de las técnicas aplicables al análisis del sitio, apoyados en estudios sobre las más efectivas y convenientes. La primera de las pruebas empleadas en la investigación de sangre es la presuntiva, la cual puede ser aplicada en la escena, donde son muy empleados de manera tradicional los métodos químio-luminiscentes, su aplicación se orienta a revelar la presencia de los rastros latentes de sangre⁹⁻¹¹.

Entre los reactivos químicos más utilizados en casos de investigación forense en escena se encuentra el Bluestar forensics®, el cual crea una luminiscencia al oxidar el hierro contenido en la sangre^{3,12}. Este compuesto químico es altamente sensible en muestras donde la sangre ha sido lavada o se encuentra degradada, no requiere oscuridad total, no altera el ADN, es recomendado para uso dentro de los laboratorios forenses, y permite recuperar los perfiles genéticos³. Es importante tener claro que el Bluestar forensics® aplicado sobre superficies que han sido limpiadas con hipoclorito genera una reacción de quimioluminiscencia total de la superficie, que puede conducir a falsos positivos.



Los investigadores de escena una vez recolectan los elementos deben enviarlos a los laboratorios forenses para que se les practiquen otras pruebas, las más conocidas son las pruebas presuntivas, muy empleadas, y entre ellas una de las más usadas es la prueba de Thevenon y Roland (Piramidón). Esta técnica parte de la actividad catalítica tipo peroxidasa del grupo HEMO de la hemoglobina que indica que no se puede excluir la presencia de sangre^{3,13}. Los métodos que usan la reacción de peroxidasa tienen la ventaja de ser económicos y sensibles, pero son poco específicos, lo que se traduce en falsos positivos al presentar resultados con otras sustancias que poseen actividad tipo peroxidasa, como la carne, el pescado, los vegetales verdes y amarillos, así como preparados con hierro, drogas y sustancias químicas^{3,9}.

Las pruebas de confirmación se realizan luego de las pruebas presuntivas, siempre y cuando se disponga de muestras suficientes para el análisis genético. Anteriormente se utilizaban métodos basados en la detección de proteínas humanas a través de análisis que requerían mucho tiempo y equipos especializados, ahora se dispone de técnicas inmunocromatográficas que han permitido mejorar los resultados con un procedimiento más sencillo y rápido al detectar específicamente la hemoglobina humana^{3,13}. El principio se basa en que si hay hemoglobina humana en la mancha que se desea analizar, esta reaccionará con el anticuerpo antihumano monoclonal móvil y se formará un complejo móvil antígeno-anticuerpo. Este complejo migra a través de la membrana absorbente hacia la zona “T” del test. En esta zona, un anticuerpo monoclonal antihumano de hemoglobina es inmovilizado, y captura el complejo anteriormente nombrado para formar un “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo, cuando la concentración de hemoglobina humana está sobre el límite de detección (0.05 g/ml)^{3,7}.

Una vez se ha confirmado la presencia de sangre se procede en el laboratorio a extraer el ADN para la individualización. Para ello se han empleado diversos protocolos, pero todos deben cumplir una doble misión: extraer del núcleo y purificar eliminando la máxima cantidad de residuos celulares y sustancias contaminantes que puedan interferir en el estudio. Uno de los métodos más útiles para lograr este proceso es el uso del Chelex 100, una resina que capta iones polivalentes para extraer el ADN a partir de diferentes sustratos de manera rápida, sencilla e incluso en muestras escasas^{5,6}. Luego de la extracción se procede a determinar la concentración recuperada en la muestra examinada, para lo cual existen diferentes métodos: como los espectrofotométricos, electroforéticos, Southern Blot, entre otros. Finalmente, se realiza el estudio genético del mismo por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y



secuenciación de ADN para obtener el perfil genético que va a ser comparado con la muestra de referencia y el obtenido en la investigación.

Dentro de la investigación de un hecho todos los procesos se deben articular y concatenar desde la parte preanalítica, analítica y postanalítica, para el logro de buenos resultados^{4, 14}. Realmente los investigadores y los laboratoristas forenses se enfrentan a una incierta y frecuente situación en la conducta criminal, cuando desaparece cualquier indicio que pueda ser empleado como prueba de su participación, viéndose obligados a realizar la búsqueda con reactivos químicos como el Bluestar forensics®, del cual es importante discutir y revisar su eficiencia en la práctica de rutina y evaluar el efecto sobre la prueba preliminar, de confirmación y de ADN en la investigación de manchas de sangre^{3, 6, 9, 13, 15}, para garantizar que los procedimientos efectuados durante las investigaciones de sangre sean trazables y eficaces hasta su principio fundamental: el esclarecimiento de la verdad.

Materiales y métodos

Muestras

Para el desarrollo de los diferentes experimentos se elaboraron veintidós (22) manchas de sangre asignadas al azar con el fin de conducir al estudio ciego, luego se depositaron en diferentes soportes previamente desinfectados y esterilizados, se dejaron secar durante 48 horas a temperatura ambiente simulando condiciones de escena. Finalmente se tomaron dos muestras por limpieza con hisopo de algodón estéril, una sin exposición a Bluestar forensics® y otra luego de la aplicación del mismo.

La selección de las muestras empleadas en este estudio y los soportes se ajustaron de acuerdo con las condiciones normales que llegan a un laboratorio de criminalística. Además se tuvo en cuenta el límite de detección de cada uno de los métodos, algunos componentes y condiciones que originan falsos positivos, negativos que interfieren con los resultados para las diferentes técnicas de Bluestar forensics®, Thevenon y Roland, inmunocromatografía y análisis de ADN.

Límite de detección

Se hicieron diluciones de sangre de 1:1 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:12000, valores correspondientes a los límites de detección, definidos en las pruebas preliminares y sustentadas en los estudios de validación existentes en los insertos de los kits utilizados.



Condiciones de la muestra

- Soportes evaluados: algodón, tela jean, tela sintética, vidrio, tierra.
- Exposición a temperaturas: 40 °C, 100 °C por 2 horas, y temperatura ambiente por tres días.
- Interferentes considerados: hipoclorito, detergente, formol, ácido acético y lugol.
- Todas las muestras se procesaron en condiciones que garantizaran su integridad y evitaran la contaminación con otro tipo de muestra biológica, para lo cual se usaron cabinas de flujo laminar, material nuevo y estéril, y los analistas emplearon los implementos de bioseguridad adecuados.
- Para cada una de las pruebas realizadas se utilizaron controles positivos (sangre humana) y controles negativos (agua estéril).

Bluestar forensics®

Se utilizó como técnica de detección de manchas en escena el Bluestar forensics® no destructor de ADN. Aplicado el reactivo en las muestras, se observa la quimioluminiscencia presentada y se registra el tiempo de reacción para cada muestra.

Prueba presuntiva

Se empleó el Test de Thevenon y Roland ¹³ para demostrar la presencia presuntiva de sangre, realizando extractos de las muestras en agua destilada estéril. Los reactivos se prepararon el mismo día del uso para asegurar su estabilidad. Se interpretó como positiva la presencia de un cambio de color a rosado al reaccionar la sangre con la solución de 4-amino-antipirina, ácido acético y peróxido de hidrógeno, y negativo no se observa cambio de color.

Prueba confirmatoria

Como prueba confirmatoria se utilizó la técnica ABACard® HemaTrace® para la detección de sangre humana. Cada muestra tratada y no tratada con Bluestar forensics® se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante realizando el desplazamiento de la muestra a través de la membrana para su lectura en los primeros diez (10) minutos.

Extracción y cuantificación de DNA

Con el sedimento recuperado de los procesos iniciales se utilizó el Método de extracción con resinas quelante CHELEX¹ que atrapan cationes, las cuales activan DNAsas, separan el ADN de las moléculas proteicas y permiten obtener ADN monocateriano.



La cuantificación se realizó por medio del kit semicuantitativo DNA Dip-Stick™ Kit, específico para DNA, el cual, al efectuar un Southern Blot sobre una membrana, permite estimar la cantidad de DNA, RNA u oligonucleótidos (de 6 bases en adelante) en las muestras. El rango de detección de ADN exacto es de 0.1-10ng/μL.

Resultados

En la Tabla 1 y la Figura 1 se relacionan los resultados de las nueve muestras analizadas con presencia de sangre en diferentes condiciones y que mostraron la reacción quimioluminiscente. Solo el hipoclorito de sodio presenta reacción al contacto con el reactivo químico sin tener el analito, y 12 especímenes negativos para sangre no fueron positivos para la reacción luminiscente.

Se observó que el agente químico Bluestar forensics® no afecta las pruebas presuntivas, de confirmación y de ADN al ser usado en las manchas de sangre que no han sido diluidas (ver Tabla 2).

Tabla 1. Muestras expuestas a Bluestar forensics®.

Muestra	Resultado
Saliva, óxido, detergente, peróxido de hidrógeno, catalasa vegetal, vino tinto, vidrio, lugol, formol, semen, orina, ácido acético, control negativo.	<i>Negativo</i>
Hipoclorito, sangre expuesta al ambiente tres días, tierra con sangre, sangre total, sangre a 90 °C, Sangre a 40 °C, sangre descompuesta, tela sintética con sangre, tela jean con sangre, sangre animal, control positivo	<i>Positivo</i>

Positivo: Presencia de quimioluminiscencia

Negativo: No quimioluminiscencia

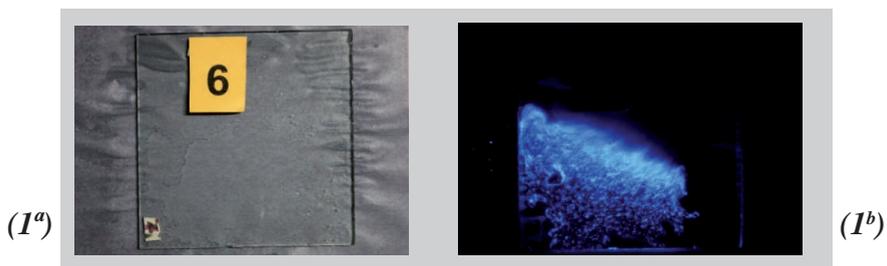


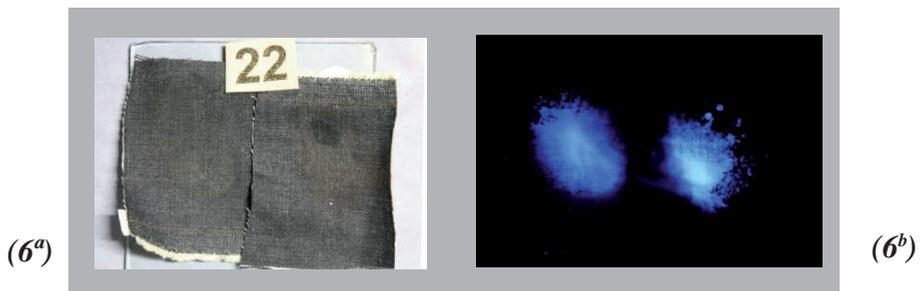
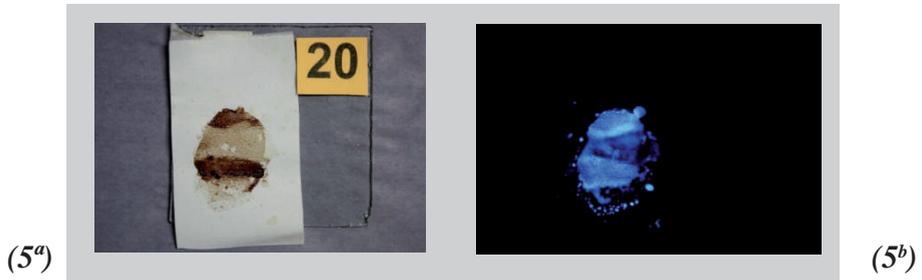
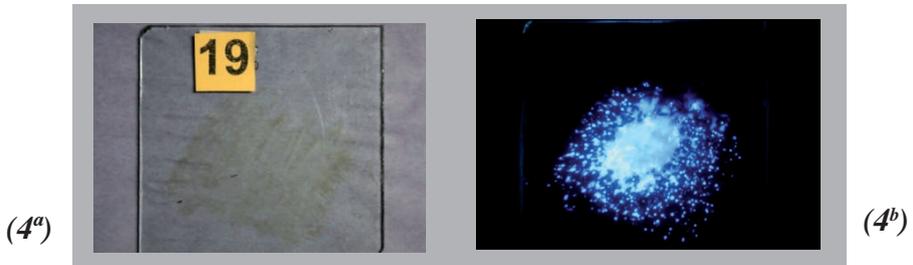
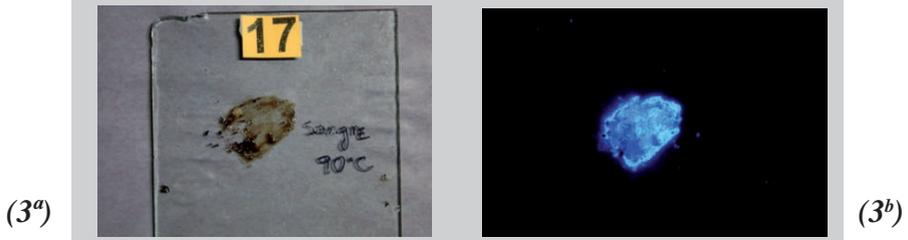
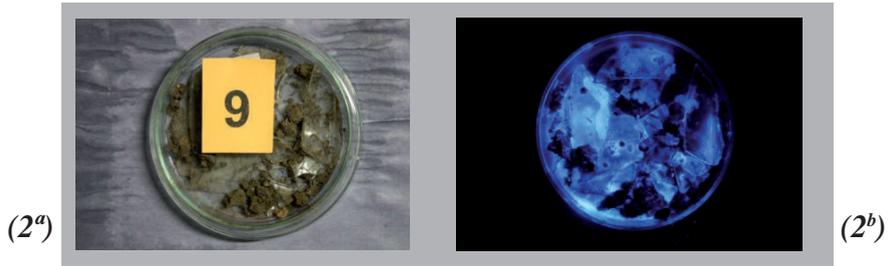
Tabla 2. Pruebas presuntivas, de confirmación y de ADN en diferentes estadios de manchas de sangre expuestas a Bluestar forensics®.

Muestra	Prueba presuntiva	Prueba de confirmación	Prueba de cuantificación de ADN
<i>Sangre expuesta al ambiente tres días</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Tierra con sangre</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Sangre a 90 °C</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Sangre a 40 °C</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Sangre descompuesta</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Tela sintética con sangre</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Tela jean con sangre</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Sangre animal</i>	Positivo	Negativo	Negativo

Muestra sin Bluestar - Muestra con Bluestar

Figura 1. Observación sin Bluestar forensics® y con Bluestar forensics® para las muestras (1) hipoclorito, (2) tierra con sangre, (3) sangre expuesta a 90°C, (4) sangre descompuesta, (5) sangre en tela sintética, (6) tela jean con sangre.





Efecto del Bluestar forensics® sobre las pruebas preliminares y de análisis de ADN en la investigación de manchas de sangre



Al evaluar el límite de detección comparando los diferentes métodos hay variaciones; en diluciones menores de 1:1.000 se detectó sangre para los tres métodos (Bluestar forensics®, pruebas preliminares y ADN), el límite de detección para Bluestar forensics® fue: 1:8.000. En diluciones de 1:12.000 las pruebas preliminares detectan sangre (ver Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de las pruebas preliminares, de Bluestar forensics® y de ADN en diferentes diluciones de sangre.

Concentración	Bluestar forensics®	Prueba presuntiva de confirmación	Prueba de cuantificación de ADN
1:1000	<i>Positivo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Positivo</i>
1:8000	<i>Positivo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
1:12000	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>

Discusión

Los agentes químicos como el Bluestar forensics® permiten apoyar las investigaciones judiciales. Aunque sirven para guiar y obtener resultados, los tests presuntivos, como las pruebas Thevenon y Roland, siguen siendo sensibles para la identificación de posible sangre; los límites de detección de estas pruebas dejan claro lo que ya se ha documentado en diferentes artículos, son más sensibles y económicos, aunque no sean específicos^{6, 14, 16}.

El efecto negativo del Bluestar forensics® sobre las pruebas confirmatorias no logra demostrarse, hay correlación entre los hallazgos positivos y la presencia de sangre humana. Si bien se presentan falsos negativos por exceso de hemoglobina ante una dilución de 1:1, esto se explica por el fenómeno de prozona, muy frecuente en las muestras con exceso de antígeno¹⁵.

No se logra justificar un daño en los resultados del análisis de ADN para cuantificación por el Bluestar forensics®, es importante destacar que los análisis se realizaron en un periodo menor a diez (10) días, algunos autores describen degradación del ADN tras el efecto en el tiempo. En el caso de esta investigación, se llegó hasta cuantificación de ADN, por lo tanto sería importante para futuras investigaciones evaluar en el tiempo la posible degradación y considerar la amplificación y tipificación. Es significativo considerar los tiempos de análisis



en las pruebas de laboratorio para manchas de sangre críticas a la hora de valorar la confiabilidad de los resultados^{9, 17}.

La influencia del factor de dilución de la muestra es considerada valiosa para la recuperación de ADN. Mientras el ADN se recupera en diluciones de hasta 1:1000 con todos los métodos de análisis, no ocurre lo mismo con el Bluestar forensics®, cuyos límites de detección van de 1:8000 y mayores a 1:12000 para los métodos de Thevenon y Roland, lo que puede llevar a pruebas presuntivas positivas y análisis de ADN negativos. Un aspecto significativo a la hora de realizar los análisis de las escenas es la recuperación de la muestra, la cual debe hacerse por técnica de doble recuperación, si bien la muestra es escasa, el líquido que se le adiciona al ser revelada con Bluestar forensics® incrementa aún más la mezcla y el factor de dilución.

El hipoclorito de sodio dio positivo para la prueba de Bluestar forensics®, este reactivo es capaz de amplificar la emisión de quimioluminiscencia en la oxidación, lo que se traduce en un falso positivo. Si bien es agente capaz de producir reacción, el comportamiento del tiempo de reacción no es el mismo, por ello vale la pena considerar un período de lectura de la prueba; requisito indispensable para una adecuada interpretación de los resultados.

Finalmente, sin un análisis integral no es posible hacer una articulación de los procesos desde la escena hasta el laboratorio con el fin de conocer las condiciones y comportamientos de cada uno de los métodos y los efectos que los mismos puedan tener, para dar la razón a las verdaderas implicaciones que los resultados involucran para las investigaciones que se traducen en verdades tras las decisiones judiciales.

Agradecimientos

Al semillero de biología y genética forense del Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria, y especialmente a los estudiantes que semestre a semestre enriquecen la labor del grupo de trabajo.

Referencias

1. Phillips K, McCallum N, Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci Int Genet.* 2012 March; 6(2): 282-5.



2. Wawryk J, Odell M. Fluorescent identification of biological and other stains on skin by the use of alternative light sources. *J Clin Forensic Med.* 2005 December; 12(6): 296-301.
3. Arbeláez Murillo LF, Ríos Herrera LS. Validación de los métodos Bluestar Forensic Free y Tevenon Roland - Piramidón como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense, LBIF-INMLyCF, Bogotá 2009. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
4. Bittencourt EAA, Soares - Vieira JA, Geenen Angeramis N, Silva CE da, Hirschfeld RC da R, Miazato Iwamura ES. The analysis of biological samples from crime scene for a future human DNA profile confrontation. Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain STR profiles for human identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2009 December; 2(1): 194-5.
5. Lincoln CA, McBride PM, Turbett GR, Garbin CD, MacDonald EJ. The use of an alternative light source to detect semen in clinical forensic medical practice. *J Clin Forensic Med.* 2006 May 1; 13(4): 215-18.
6. Peschel O, Kunz SN, Rothschild MA, Mützel E. Blood stain pattern analysis. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011 September 1; 7(3): 257-70.
7. Hurley IP, Cook R, Laughton CW, Pickles NA, Ireland HE, Williams JHH. Detection of human blood by immunoassay for applications in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2009 September 10; 190(1-3): 91-7.
8. Council TI, McKillip JL. Forensic blood evidence analysis using RNA targets and novel molecular tools. *Biologia (Bratisl).* 2010 April 1; 65(2): 175-82.
9. De Almeida JP, Glesse N, Bonorino C. Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int.* 2011 March 20; 206(1-3): 58-61.
10. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *(Talanta)* 2007 May 15; 72(3): 896-913.
11. Castelló A, Francés F, Verdú F. Bleach interference in forensic luminol tests on a non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* 2009; 188(1-3): 1-17.



12. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Bär W, Banemann R, Berti A, et al. RNA/DNA co-analysis from blood stains—Results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 January; 6(1): 70-80.

13. Mahecha H, María P C. Evaluación de la prueba ABACard HemaTrace para la identificación de sangre humana contra la prueba de oro contra inmuno electroforesis, en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Noroccidente. 2007.

14. Passi N, Garg RK, Yadav M, Singh RS, Kharoshah MA. Effect of luminol and bleaching agent on the serological and DNA analysis from bloodstain. *Egypt J Forensic Sci.* 2012 June; 2(2): 54-61.

15. Tsukada K, Harayama Y, Shimizu M, Kurasawa Y, Kasahara K. Influence of presumptive reagents on DNA typing. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2011 December; 3(1): e375-e376.

