

Informe final

Jimenez Colín Enrique Daniel

Matricula: 2142028306

Fiscalía General de la Republica; Coordinación
General de Servicios Periciales; Laboratorio de
Genética Forense

Del 01 de Marzo del 2019 al 02 de Septiembre del
2019

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Xochimilco

Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Nombre del Programa: Mejora continua en los
procesos jurídicos, administrativos, económicos,
materiales, tecnológicos y de comunicación en la
procuración de la justicia de la FGR

Nombre del asesor interno: Dr. Martin Gómez
Hernández

Nombre del asesor externo: IBQ. César Alejandro
Cuevas Melo

Análisis del kit “Bluestar Forensic” como prueba presuntiva de rastros de sangre latente

Introducción

En la genética forense, existen diversas pruebas presuntivas para rastros de sangre, que permiten a los peritos determinar si es necesario realizar un análisis más exhaustivo con técnicas o pruebas más específicas, que permitan confirmar su presencia, así como para proceder a la obtención de ese perfil genético, para esto hay una amplia variedad de reactivos químicos que se pueden utilizar para detectar evidencia hematológica latente en un lugar de los hechos.

En general, hay dos tipos principales de reactivos químicos para detección de sangre. Un tipo de reactivos forman complejos coloreados con las proteínas de la sangre, específicamente con aminoácidos, denominados "tintes" como son el amido negro, azul de Coomassie y rojo húngaro (Castañeda, 2010). El otro grupo lo constituyen reactivos oxidoreductores los cuales catalizan la oxidación de las moléculas de hemoglobina, lo que resulta en un cambio de color de este producto químico en particular, este último grupo es considerado como el más específico y sensible. Algunos ejemplos de estos productos químicos son: luminol, fluoresceína, fenolftaleína, leucomalaquita verde, leucocrystal violet y el bluestar forensic.

Durante las últimas décadas, numerosas pruebas presuntivas de sangre se han desarrollado sobre la base de estos dos principios. La elección de una prueba indiciaria depende de la especificidad, sensibilidad y fiabilidad del reactivo. (Tobe & Watson, 2007).

Este proyecto tiene como fin hacer una recopilación bibliográfica sobre Bluestar Forensic, una de las pruebas que catalizan la oxidación de la hemoglobina, el cual fue seleccionado debido a que en base a distintas fuentes bibliográficas esta prueba tiene un alto grado de sensibilidad, así como una mayor especificidad que la mayoría de las otras pruebas de su tipo. Dicho análisis ayudara a tener una idea más específica de cuál es la manera ideal de usar este kit, así como encontrar la mejor forma de analizar y evaluar los resultados que se obtengan, observando posibles falsos positivos o falsos negativos.

Objetivo General

Establecer las mejores condiciones para la determinación de sangre utilizando el “kit Bluestar Forensic” y la mejor estrategia para evaluar el resultado, con base en un análisis de la información bibliográfica disponible.

Objetivos Específicos

- Realizar la revisión bibliográfica asociada a los fundamentos químicos, a la validez del ensayo y a la aplicación en casos reales de la prueba para la detección de sangre.
- Explicar y fundamentar la reacción química que es base de la prueba de presencia de sangre.
- Determinar la utilidad del ensayo de quimioluminiscencia como prueba presuntiva de presencia de sangre, considerando la frecuencia de resultados falso positivo o falso negativo.

Marco Teórico

Los inicios de la quimioluminiscencia datan del año 1928, cuando el alemán Albrecht accidentalmente encontró una rara reacción que generaba una emisión de luz, esta reacción se generaba al combinar el 5-amino-2, 3-dihidro-1, 4 ftalacindonia con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en presencia de un catalizador tales como el cobre (CU II), el cobalto (Co III) o el hierro (Fe II). Siendo esta la primera vez que se observara la reacción del Luminol (Arbeláez y Ríos 2009).

Los primeros experimentos conducidos con miras a utilizar el luminol como una herramienta de la ciencia forense fueron conducidos en 1937 por Specht, quien lo ensayo sobre una variedad de soportes como prado, ladrillos o piedras, mojadas en sangre.

En 1939 Proesher y Moody probaron el compuesto de Specht en sangre animal y humana. En 1951, Grodsky propuso una mezcla de polvos compuesta de luminol, carbonato de sodio y perborato de sodio con agua destilada. Esta se convirtió posteriormente en la fórmula que es usada más comúnmente por los investigadores de hoy en día para detectar rastros de sangre en el lugar de los hechos. Sin embargo, el uso de carbonato de sodio produce una reacción lenta en el proceso de oxidación de la hemoglobina. Más aun, una vez que los agentes reactivos son disueltos en el agua, la vida útil de la solución es muy corta. Esta fórmula es muy inestable y es toxica, debido a la presencia del perborato de sodio.

En 1966, Weber propuso una composición hecha de luminol, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio y peróxido de hidrogeno diluido en agua destilada, dicha solución debía de guardarse en un lugar fresco y protegida de la luz directa. Aunque su vida útil es corta, la reacción luminosa obtenida por este reactivo al entrar en contacto con agentes oxido reductores, puede ser fotografiada en oscuridad total.

En el año 2000, Jean-Marc Lefebvre-Despeaux, presidente de Bluestar, encargo a Loic Blum, Ph. D., profesor de bioquímica en la universidad Claude Bernard-Lyon y director del laboratorio de ingeniería enzimática y biomolecular que encontrara una nueva fórmula que fuera basada en la el reactivo propuesto por Weber y que eliminara todos los numerosos inconvenientes. Como resultado, Blum descubrió una nueva fórmula que posteriormente fue llamada Bluestar Forensic. (Mendoza, Santos, Paredes. 2015)

Actualmente el Kit Bluestar Forensic es utilizado en las ciencias forenses como prueba presuntiva para determinar la presencia de sangre latente en el lugar de los hechos. Siendo actualmente la más utilizada en esta área ya que ha comprobado tener mejores resultados que otras pruebas presuntivas de sangre latente.

Esta prueba tiene como fin, revelar manchas de sangre que se han intentado eliminar, borrar o que son invisibles a simple vista, esta reacción actúa en base a la quimioluminiscencia y ocurre cuando la urea (una base nitrogenada) en conjunto con una sustancia fuertemente alcalina (peróxido de hidrogeno en esta prueba) en presencia de agentes oxido reductores tales como el hierro en la sangre, peroxidasas y/o catalasas hacen que se libere oxígeno del álcali y agua y que estos desplacen los nitrógenos de la urea, liberándolos; al ser estos últimos muy inestables forman fotones que se pueden observar en la oscuridad mediante la emisión de luz azul brillante.

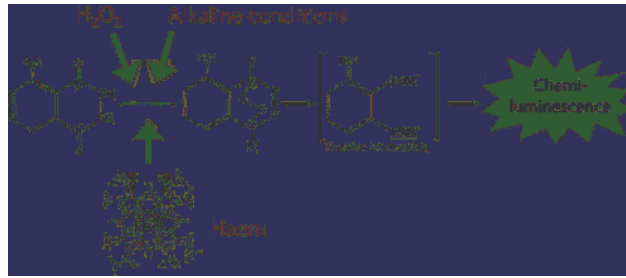


Ilustración 1: fuente: www.bluestar-forensic.com

Un caso real donde el Kit Bluestar forensic fue clave para arrestar al sospechoso, fue uno donde se involucraba a un hombre que alegó estar visitando un amigo y se quedó dormido en el sofá. Cuando despertó algunas horas después asegura haber encontrado sangre en el piso y su amigo muerto. Varias horas después del descubrimiento de su amigo muerto, decidió llamar a la policía.

Tras ser interrogado por los detectives, afirmó haber estado durmiendo en el sofá, y no vio ni escuchó nada. Cuando despertó de su siesta, descubrió la sangre y su amigo muerto.

Cuando se le preguntó que hizo tras ver el lugar de los hechos, respondió que solo acarició el cabello de su amigo y le dijo “adiós amigo”. Cuando se le pidió que fuera al baño para revisar su persona detenidamente, él dijo que encantado ayudaría, pero que sin embargo no sabía nada.

Le explicaron que querían buscar rastros de sangre, y él gustosamente extendió sus brazos y dijo “¿Lo ven? No hay nada”, y que realmente quería ayudar pero no sabía nada.

Una vez sus brazos fueron rociados con Bluestar Forensic y el sospechoso vio la sangre que creyó haber lavado de sus brazos, inmediatamente dijo “Quiero a mi abogado” y dejó de cooperar con los detectives.



Ilustración 2: fotos del involucrado antes y después de que se le aplicara el reactivo Bluestar Forensic. Fuente: www.bluestar-forensic.com

Una vez rociado con Bluestar Forensic el lavamanos del baño también reveló la presencia de sangre, dando más pruebas de su culpabilidad. (www.bluestar-forensic.com).



Ilustración 3: fotos del lavamanos antes y después de la aplicación del reactivo Bluestar Forensic. Fuente: www.bluestar-forensic.com

Metodología

Hacer una revisión bibliográfica del funcionamiento químico de la prueba, la mejor forma de aplicarla y como analizar los resultados. Así como hacer una investigación con peritos que ya están familiarizados con el uso de la prueba y de cómo esta puede ser mejor utilizada en determinadas situaciones.

Para utilizar el ensayo para determinar la presencia de sangre, utilizando el “kit Bluestar Forensic”, se seguirán las indicaciones del fabricante o proveedor.

Actividades realizadas

En todas las bibliografías revisadas se encontró, que para poder tener una mejor comparación de Bluestar Forensic con otras pruebas, así como tener una perspectiva más clara del alcance de este kit, se realizaron pruebas que si bien varían de diferente forma en cada artículo revisado, tienen algo en común lo cual es determinar la robustez, la cual tiene el fin de decirnos que sin importar la superficie donde se encuentre el rastro, el reactivo reaccionara de igual forma en todas ellas, este parámetro también incluye el cómo podría afectar el uso de ciertos compuestos para limpiar el rastro de sangre, por eso para evaluarlo se busca borrar de distintos modos dichos rastros, para así determinar si esto suficiente como para que el reactivo no reaccionara, también es evaluada la precisión, la cual se refiere a que se harán repeticiones de la muestra en la misma superficie, con la misma concentración de sangre y con el mismo tratamiento a todas las muestras, teniendo el mismo resultado en todas ellas.

Otro parámetro que se llegó a ver evaluado fue el paso del tiempo añadiendo un aspecto importante durante el uso de este kit, ya que la mayoría de las veces habrán pasado días, meses o incluso años en los que el tiempo en conjunto de otros factores ambientales puedan afectar el cómo reacciona el compuesto. Finalmente un aspecto bastante importante de este tipo de pruebas es la sensibilidad, es decir la capacidad del reactivo de reaccionar aunque la muestra este en bajas concentraciones, o bien este diluido, ya que con los propios lavados con pura agua para borrar el rastro irán diluyendo poco a poco la concentración del rastro.

Y por último también en las pruebas se llegaron a utilizar otro tipo de muestras a parte de la sangre, para poder determinar si hay algunos compuestos que puedan generar falsos positivos, los cuales son un aspecto muy importante, ya que este tipo de resultados pueden causar un problema en la continuación al uso de pruebas más específicas porque podrían ser un gasto innecesario de reactivos, por eso es importante saber distinguir si este es un falso positivo o un verdadero positivo.

Cada caja del Kit Bluestar Forensic sin importar su presentación contiene paquetes que dentro tienen 2 pastillas, una de urea (la base nitrogenada) y una de peróxido de hidrogeno (una sustancia fuertemente alcalina), estas 2 se agregaran a un recipiente preferentemente de un color opaco y a el cual se le pueda colocar un atomizador, esto para facilitar la aplicación del reactivo, posteriormente se le añadirá 125mL de agua destilada, y se agitara hasta disolver por completo las pastillas.

Actividades realizadas en el Servicio social

- Preparar soluciones de trabajo de laboratorio
- Apoyar en la elaboración y organización de documentos
- Auxiliar en la codificación y control de reactivos y suministros

- Auxiliar en las áreas de recepción de muestras
- Apoyo en el análisis de resultados de pruebas de laboratorio
- Elaborar ensayos de valoración y análisis de muestras biológicas

Robustez

Como ya se mencionó este parámetro es importante, ya que nos permitirá saber si este reactivo es eficaz en cualquier superficie, o si hay alguna que pueda afectar de manera significativa el resultado final, viéndose como una reducción de la quimioluminiscencia, o simplemente como la eliminación completa de esta. Así mismo como ya se mencionó se implementara el uso de algunos métodos de limpieza incluyendo el uso de detergentes, para ver de igual manera si estos pueden reducir la eficacia del reactivo Bluestar Forensic.



Ilustración 4: Superficies utilizados por Castañeda Serrano 2017.



Ilustración 5: Superficies inoculadas de sangre utilizados por Castañeda Serrano 2017.

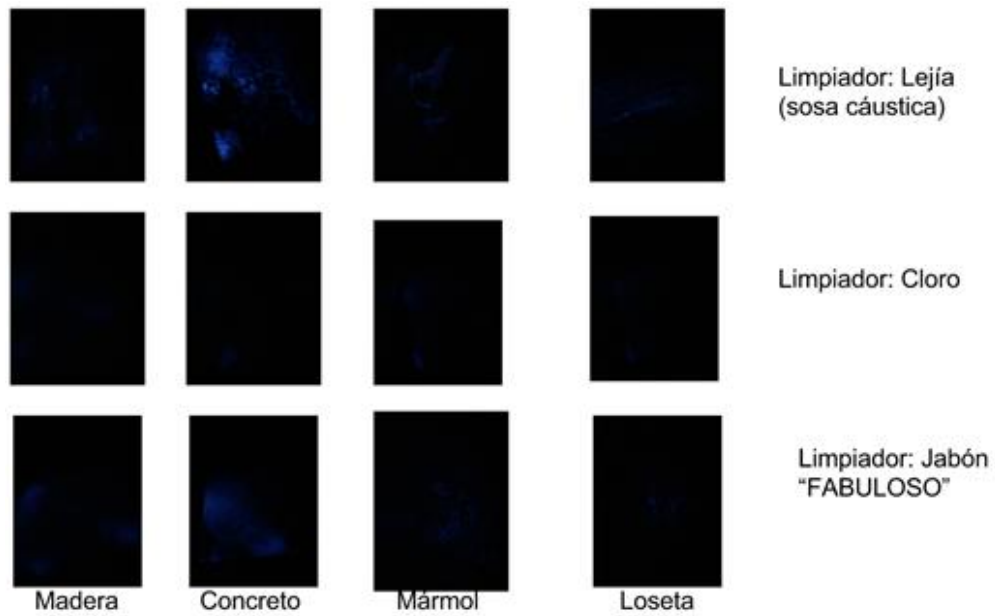


Ilustración 6: Quimioluminiscencia resultante en las superficies inoculadas con sangre, con un filtro de Word por Castañeda Serrano 2017.

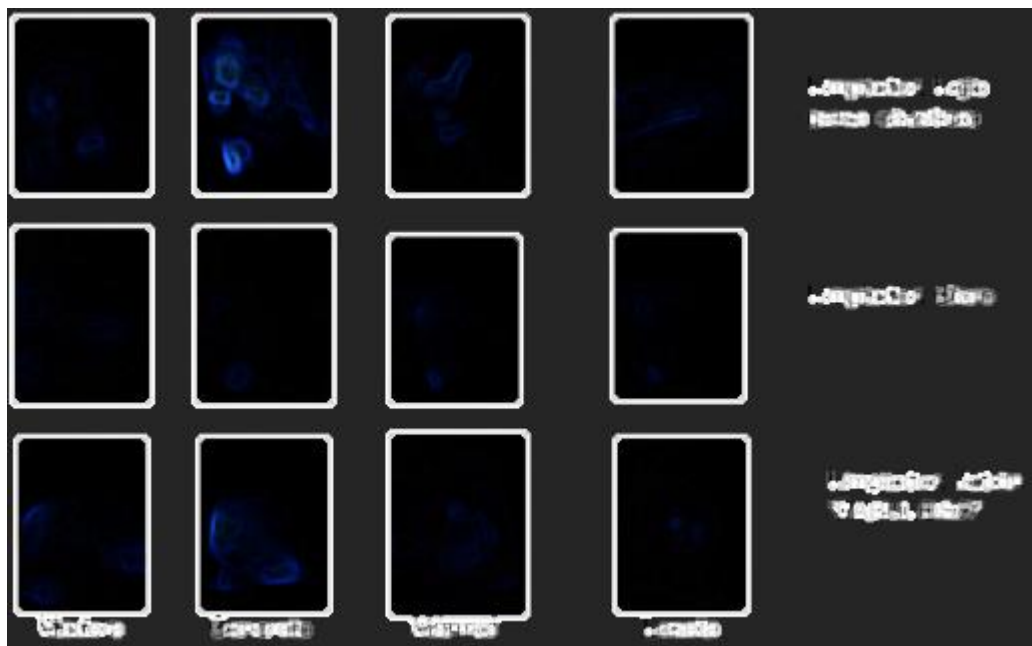


Ilustración 7: Quimioluminiscencia resultante en las superficies inoculadas con sangre, con un filtro de Word para apreciar mejor las áreas donde hay emisión de luz, por Castañeda Serrano 2017.

Como se puede observar en las imágenes tomadas de referencia, se aprecia que esos reactivos de limpieza que se utilizan comúnmente en el hogar si bien no en todos los casos, logran borrar en su mayoría los rastros de sangre en superficies de suelo.



Ilustración 8: Quimioluminiscencia del reactivo Bluestar Forensic en superficie de madera lavada solo con agua tomada de www.bluestar-forensic.com



Ilustración 9: Quimioluminiscencia del reactivo Bluestar Forensic en pared con un tapiz lavada solo con agua tomada de www.bluestar-forensic.com.

Por otro lado se observa que cuando solo se utiliza agua para borrar la mancha de sangre, es bastante notoria la emisión de luz, incluso en la ilustración 6 se puede observar que aunque no se toma la foto en completa oscuridad se aprecia bastante la quimioluminiscencia.

Paso del tiempo

Otro parámetro bastante importante en el área de la criminalística a tomar en cuenta es el paso del tiempo, ya que hay bastantes casos en los que se llega al lugar de los hechos pasados bastantes días o incluso meses después de lo ocurrido.



Ilustración 10: Resultados al aplicar Bluestar Forensic, inmediatamente después de lavados y/o pintados los sustratos. Hernández, Portela, Guataquira 2013.



Ilustración 11: Resultados al aplicar Bluestar Forensic, 3 días después de lavados y/o pintados los sustratos. Hernández, Portela, Guataquira 2013.

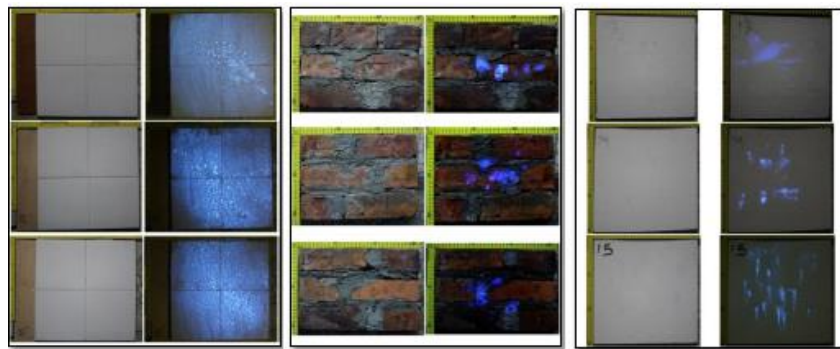


Ilustración 12: Resultados al aplicar Bluestar Forensic, 30 días después de lavados y/o pintados los sustratos. Hernández, Portela, Guataquira 2013.

En este aspecto podemos destacar que a pesar de que al menos después de un mes no se ve ninguna reducción en la quimioluminiscencia del reactivo, se debe de aclarar que esto fue llevado a cabo en un lugar con ambiente controlado y tomando ciertas medidas, por lo que no podemos afirmar que habrá el mismo resultado en los lugares de los hechos donde no hay un ambiente controlado.

Sensibilidad

Este parámetro es muy importante en esta prueba ya que nos permitirá observar si hay algún rastro latente aun si este ya se encuentra bastante diluido, esto puede ocurrir por el tratamiento de lavado que se le pudo haber dado al rastro, por factores ambientales, o simplemente por el desgaste del tiempo.

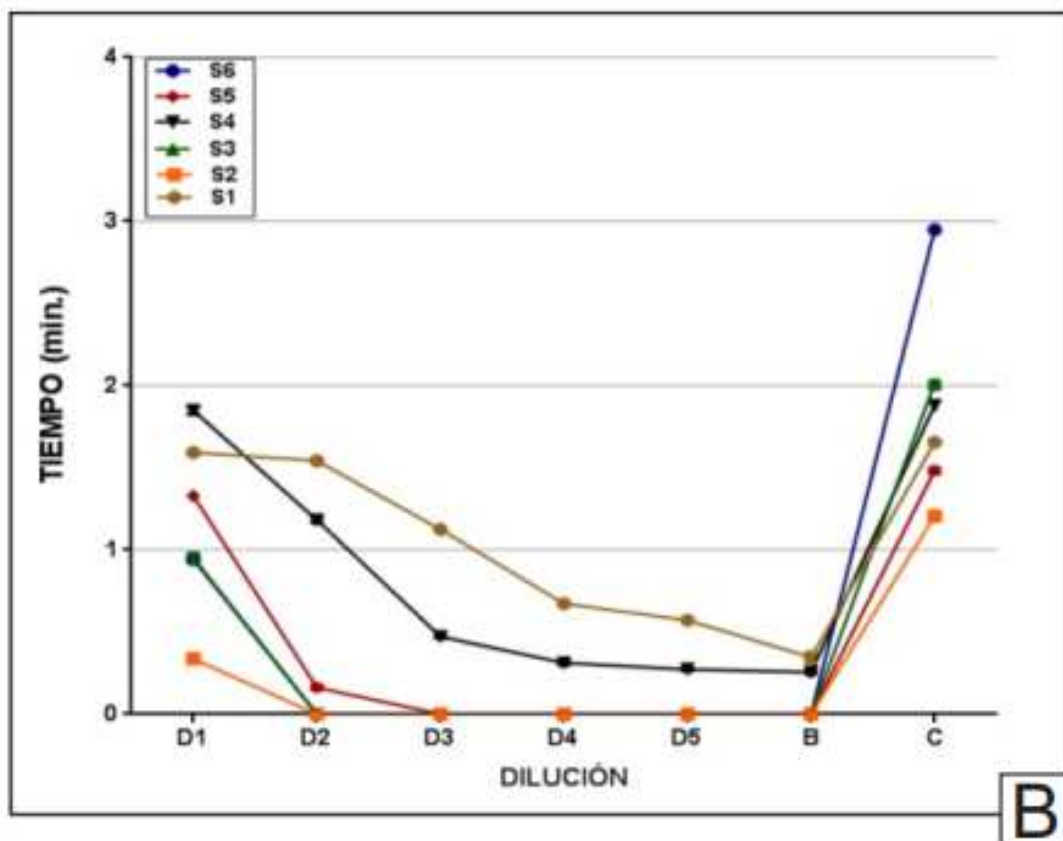


Ilustración 13: Grafica que relaciona el tiempo que dura la emisión de luz causada por el reactivo Bluestar Forensic en relación con la dilución de la muestra. Mendoza, Santos, Paredes. 2015

DILUCIÓN	SUSTRATO						PROMEDIO
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
D1	4	4	4	4	4	4	4
D2	4	0	0	4	4	0	2
D3	4	0	0	4	0	0	1
D4	4	0	0	4	0	0	1
D5	4	0	0	4	0	0	1
B	4	0	0	4	0	0	1
C	4	4	4	4	4	4	4
PROMEDIO	4	1	1	4	2	1	2

Ilustración 14: tabla de intensidad de emisión de luz causada por el reactivo Bluestar Forensic en distintos sustratos con diluciones de sangre diferentes. Mendoza, Santos, Paredes. 2015

Para este parámetro usaron 5 diluciones diferentes las cuales fueron: 1/500 (D 1) ,1/10.000 (D 2), 1/25.000 (D 3), 1/1.000000 (D 4), 1/5.00 000 (D 5), así como su respectivo blanco (B) y su muestra control (C). También usaron 6 distintos sustratos los cuales fueron: monedas de latón (S1), telas naturales de algodón (S2), madera barnizada (S3), monedas de alpaca (S4), loza cerámica (S5), vidrio (S6). Y como se observa en la ilustración 10 se aprecia que en todos los sustratos con forme va aumentando la dilución va disminuyendo el tiempo que dura la emisión de luz, pero resaltando que los sustratos 1 y 4 son los que mantienen más tiempo la reacción a mayores diluciones, y el caso del sustrato 6 en el que es muy poco el tiempo que se puede apreciar la emisión de luz, se puede decir eso y no que no haya una reacción al observar la ilustración 11 donde podemos apreciar que el sustrato 6 aunque solamente hay una reacción en la dilución 1, esta muestra una intensidad de 4 puntos, siento

esta la más alta en esta prueba. Por otro lado al seguir evaluando la ilustración 11, se vuelve a observar que los sustratos 1 y 4 son los que mejores resultados arrojan ya que en todas las diluciones hay una buena emisión de luz, y con los otros sustratos claramente se observa el impedimento que causan al reducir considerablemente o totalmente la reacción en mayores diluciones.

Falsos positivos y falsos negativos

Llegados a este punto es importante saber qué cosas a parte de la sangre humana podría darnos resultados positivos, siendo estos los falsos positivos, así mismo en qué casos a pesar de que haya sangre humana por impedimento del sustrato o el tratamiento den negativos, siendo estos los falsos negativos. Para esta evaluación se tomaron los resultados obtenidos por la tesis titulada "Validación de las técnicas Bluestar Forensic y Luminol para detección de sangre en manchas de interés criminalístico en el laboratorio." (Sarmiento Yengle. 2015), ya que utilizo bastantes muestras a parte de sangre así como sangre de otros animales, también al haber hecho repeticiones permitirá confirmar de que existan los casos de falsos positivos y falsos negativos ya mencionados.

A continuación se muestra una tabla mostrando los falsos positivos y los falsos negativos

Falsos positivos	Falsos negativos
Rábano	Telas naturales de algodón en diluciones mayores a 1/10000
Sangre de pescado	Madera barnizada diluciones mayores a 1/10000
Sangre de res	Loza cerámica diluciones mayores a 1/10000
Sangre de cerdo	Vidrio diluciones mayores a 1/10000
Sangre de pollo	En cualquier superficie o sustrato que sea liso o bien no tenga rugosidad donde pueda adherirse mejor los restos de sangre con un tratamiento con sustancias de limpieza como es el cloro, detergente o lejía se reducirá bastante la intensidad de la reacción, o bien la eliminara por completo.
Isodine	
Cloruro férrico	
Tiocinato de potasio	
Sulfato de zinc	
Sulfato de hierro	
Perborato de potasio	
Permanganato de potasio	
Hipoclorito	
Detergente	
Amoniaco	
Lugol	
Sosa caustica	
Ácido acético	

Por otro lado hay que recalcar que algunos peritos que tienen experiencia con este reactivo, a los cuales les preguntamos sobre el tema, nos contestaron la duda del porque el hipoclorito, el detergente y la sosa caustica daban un falso positivo pero al limpiar con ellos los rastros de sangre podían casi eliminar por completo la emisión de luz, comentaron que esto ocurría porque estas pruebas cuando aplican el cloro, el detergente y la sosa para ver si son falsos positivos no la enjuagan solo las aplican y dejan secar, por otro lado cuando limpian cualquier rastro de sangre después de usar cualquier sustancia de limpieza utilizan agua para enjuagar eliminando así lo que queda de estas sustancias de limpieza junto con los rastros de sangre. Así mismo comentaron que con forme se va tomando experiencia al usar el kit Bluestar Forensic, les es posible diferenciar de un falso positivo de un verdadero positivo, afirman que aunque puedan a llegar la misma intensidad el color es ve de diferentes tonos.

Recomendaciones

- Un aspecto que se tiene que tomar en cuenta, a parte de que tiene que dársele un uso casi inmediato al reactivo después de su preparación, como indica el proveedor, es que al ser un reactivo fotosensible este al ser preparado deberá almacenarse en un contenedor que lo protege de la luz para evitar su pronta degradación.
- Utilizar la protección pertinente señalada en la caja del kit para evitar cualquier riesgo en la salud.
- Utilizar el reactivo dentro de las primeras 8 horas de su preparación, ya que después de ese tiempo el pH del reactivo aumenta, lo que causa que el ADN con el que entre en contacto se degrade, haciendo que aunque se pueda confirmar la presencia de rastros de sangre latente, no se podrá tomar una muestra del ADN viable para futuras pruebas.
- Es recomendable usar en conjunto con otras pruebas presuntivas de sangre tales como Thevenon Roland Piramidon o la técnica de Kastle-Meyer para tener un resultado más concluyente.

Conclusiones

- Para tener un mejor resultado al utilizar el Kit Bluestar Forensic es importante que la prueba se lleve a cabo en un cuarto oscuro y utilizar el reactivo recién se haya preparado, para evitar que este aumente su pH y así pueda dañar los rastros de ADN en caso de que haya.
- El Kit Bluestar Forensic al ser una prueba presuntiva y no confirmativa, para poder descartar posibles falsos negativos es idóneo complementar con otras pruebas presuntivas de sangre latente, que pueden ser Piramidón, Fenolftaleína, Luminol.
- Estas pruebas son indispensables para presumir la presencia de rastros de sangre latente, así mismo es recomendable usar el Kit Bluestar Forensic como la referencia principal aunque se utilicen otras técnicas de detección de sangre latente ya que en comparación con las otras pruebas de este tipo es actualmente la más sensible y específica, así mismo de esta forma se evitara el gasto innecesario de reactivos, de otras pruebas que son confirmativas o incluso el desperdicio de reactivos para la extracción de ADN.

Bibliografía

1. Investigación criminal. José D. Contreras. México. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/3993807/Tema-2-Investigacion-Criminal>
2. Bluestar Reactivo revelador para manchas de sangre oculta. Cienciaforense.cl Revista Online de criminalística. 2009. Disponible en: <http://cienciaforense.cl/csi>
3. Bluestar Forensic el mejor revelador de manchas de sangre oculta en la escena del crimen. Madrid, España. Disponible en: www.bluestar-forensic.com
4. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect of high molecular-weight DNA. Shanana S. Tobe, Nigel Watson. Journal Forensic Sci. 2007.
5. Identificación De Metaloproteinasa 9 (Mmp 9) Por Ensayos De Western Blot. Castañeda, M. J. Veracruz, México: Universidad veracruzana. 2010

6. Validación de los métodos Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense, LBIF-INMLyCF. Luisa Fernanda Arbeláez Murillo, Linda Sorieth Ríos Herrera. Bogota. 2009. Disponible en: https://www.bluestar-forensic.com/medias/documentationfile/tesis327_co.pdf
7. Efecto del sustrato sobre las pruebas de orientación quimioluminiscentes (bluestar forensic y luminol) en la detección de restos hemáticos. Diana Mendoza Ramos, Juan Santos Lovaton, Wilmer Paredes Fernández. Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional de San Agustín. Área de Biología Forense, Departamento de criminalística, Policía Nacional del Perú. Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular. 2015.
8. Validación de las técnicas Bluestar Forensic y Luminol para detección de sangre en manchas de interés criminalístico en el laboratorio. Valery Roxana Sarmiento Yengle. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2015.
9. Análisis comparativo entre el reactivo de luminol y Blue-star para la identificación de sangre alterada con diversos limpiadores en las distintas superficies más comunes de México, para la identificación de indicios biológicos forenses. Alfonso Emmanuel Castañeda Serrano. México. 2017.
10. Efecto del tiempo del reactivo Bluestar Forense con evidencia hematológica en superficies de baldosa, ladrillo y vinilo. Cesar Augusto Hernández Rodríguez, William Eduardo Portela Trujillo, Diego Fernando Guataquira Raigoza. Policía Nacional. Escuela De Investigación Criminal. Bogotá, Colombia. 2013