

Transferencia del método de inmunocromatografía para determinación de sangre humana en manchas forenses, empleando Rapid Signal Occult Blood Cassette Organics

TRANSFER METHOD FOR DETERMINING IMMUNOCHROMATOGRAPHY HUMAN BLOOD STAIN IN FORENSIC, OCCULT BLOOD USING RAPID SIGNAL CASSETTE ORGENICS

**Gloria Amparo López Restrepo¹, Luz Eliana Giraldo Vasquez,²
Beatriz Elena Gómez Muñoz³**

Resumen:

El Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INML y CF) realizó en la ciudad de Bogotá la validación del método de inmunocromatografía Rapid Signal Occult Blood Cassette de la marca Organics y el Laboratorio de Biología y Genética Forense del INML y CF de Medellín debe realizar la transferencia de este método analítico, para lo cual se hicieron diluciones 1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:200.000, 1:500.000, 1:1'000.000 y 1:10'000.000 a partir de manchas de sangre y sangre líquida, con el fin de determinar el límite de detección, reproducibilidad y repetibilidad del método bajo las condiciones ambientales de temperatura y humedad de la ciudad de Medellín.

Los resultados obtenidos a partir de los 120 análisis de inmunocromatografía realizados mostraron reproducibilidad y repetibilidad concordantes a la validación realizada en el INML y CF de la ciudad de Bogotá, para el método y los dos analistas; el índice de kappa fue de 0.90 lo que muestra una concordancia fuerte. Por otro lado, el límite de detección para muestras de sangre líquida fue de 1:100.000 y de 1:10.000 para manchas este resultado es muy similar al obtenido con el kit de

ABAcad para uso forense. Por lo anterior, el método de inmunocromatografía Rapid Signal Occult Blood de la marca Organics puede ser empleado en uso forenses en el Laboratorio de Biología y Genética Forense del (INML y CF) de la Regional Noroccidente Seccional Medellín.

Palabras claves: Transferencia, validación, límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad, inmunocromatografía.

1. Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. E-mail lopezrestrepogloria@hotmail.com. 2. Bacterióloga Laboratorista Clínica, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses. Msc Epidemiología. Docente Tecnológico de Antioquia IU. 3. Beatriz Elena Gómez Muñoz. Bacterióloga Laboratorista Clínica, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Docente.

Abstract:

The National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences (INML y CF) held in the city of Bogota immunochromatography method validation Occult Blood Rapid Signal Cassette Organics brand and the

Laboratory of Forensic Biology and Genetics of the INML y CF Regional Medellin should make the transfer of this analytical method, for which dilutions were 1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:200.000, 1:500.000, 1:1'000.000 and 1:10'000.000 from bloodstains and liquid blood and with the aim to determine the limit of detection, reproducibility and repeatability of the method under ambient conditions of temperature and humidity of the city of Medellin . This made an experimental study.

The results obtains for the 120 immunochromatography analysis showed consistent reproducibility and repeatability of the validation performed in the INML y CF and the city of Bogota, for the method and the two analysts, the kappa index was 0.90 which indicates a strong concordance. On the other hand the limit of detection for liquid blood samples was 1:100.000 and 1:10.000 for spots this result is very similar to ABACard kit for forensic use. Therefore, the immunochromatographic method Occult Blood Rapid Signal Organics brand can be used in the Laboratory of Forensic Biology and Genetics of the (INML y CF) Northwest Regional Medellin branch.

Keywords: Transfer, validation, detection limit, reproducibility, repeatability, immunochromatography.

Introducción

Las numerosas manifestaciones de violencia se han convertido en un problema de Salud Pública en Colombia ⁽¹⁾. Por lo anterior en las investigaciones realizadas para el estudio de la violencia se recuperan evidencias físicas (EV) o elementos materia de prueba (EMP) de tipo biológico y no biológico, tienen en común el ser insuficientes, estar degradadas o contaminadas con otros fluidos, con sustancias contenidas en el soporte o con factores ambientales, además de ser únicas e irrepetibles ^(2,3).

Los EMP de tipo biológico son los restos de sangre, semen, pelos, restos óseos y diversos fluidos corporales. Los restos de sangre pueden orientar al investigador a ubicar el lugar de los hechos, establecer el tipo de delito, el

elemento y lo que causó la lesión, arma, e incluso vincular o desvincular autores materiales del hecho, teniendo en cuenta a la sangre como el vestigio más importante y frecuente se hace necesario el uso de pruebas de laboratorio para su identificación ⁽⁴⁾. La marcha analítica, para la investigación forense de una mancha de sangre, presenta como primer paso una prueba de orientación denominada Test de Piramidón, la cual se vale de la actividad catalítica tipo peroxidasa del grupo HEMO de la hemoglobina para determinar de forma preliminar la presencia de ésta ^(2,4). Luego de obtener un resultado de laboratorio positivo se hace necesario demostrar su origen, si es humana y a quien pertenece por medio de pruebas genéticas. Para este proceso tan importante dentro de una investigación se requiere que los analistas empleen pruebas

preliminares, rápidas, económicas y fáciles de utilizar.

Las pruebas de confirmación han ido evolucionando, actualmente se obtienen resultados más eficaces con procedimientos más simples, anteriormente se detectaban proteínas humanas como globulinas y otras proteínas; métodos muy dispendiosos, costosos, que requerían equipos especiales e incluso tardaban días para obtener un resultado, hoy se ha llegado al punto de detectar específicamente la hemoglobina humana a través de pruebas inmunocromatográficas que no requieren equipos especializados y el tiempo de obtención de resultados es mucho más corto^(5,6,7).

Si bien estas pruebas inmunocromatográficas son sencillas y muy útiles, es necesario aportar un resultado confiable al realizar el

análisis de manchas de sangre y asimismo se hallen validadas a nivel forense. Los Laboratorios en aras de garantizar la calidad de sus procesos, se rigen por la norma NTC-ISO-IEC-17025-2005, que contempla requisitos generales de para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración particularmente en el ítem: Requisitos de Gestión numeral 4.1 Organización, se especifica *“El laboratorio debe tener políticas y procedimientos para evitar que pueda disminuir su confianza”*.⁽¹⁴⁾

La validación del método para análisis genético de manchas de sangre se realizó en el laboratorio de Biología y Genética Forense del INML y CF en el año 2009, para este procedimiento se realizó la prueba inmunocromatográfica con el Kit comercial que para el momento se empleaba: ABACard Hema Trace.

La división de Control Forense por directriz nacional estableció cambio de marca del kit de uso forense por la técnica Inmunocromatográfica Rapid Signal Occult Blood Casete marca Organics, cuyos aglutinógenos son los antígenos usados en laboratorio clínico para detectar sangre oculta en materia fecal pero que demuestra la presencia de componentes específicos de la sangre, como los antígenos de la hemoglobina humana (Hbh)^(3,7), los cuales son útiles para el estudio forense de una mancha de sangre, previa validación realizada por el laboratorio de Biología Forense del INML y CF de la Dirección Regional Bogotá se demostró experimentalmente alta sensibilidad y especificidad; resultados rápidos, óptimos y confiables^(6,14.).

Por lo anterior una vez se valida en un sitio, se hace necesario poner en

funcionamiento la técnica en otros laboratorios diferentes y para ello se realiza una transferencia del método, con la verificación en cada uno de los Laboratorios y para el caso, el Laboratorio de Biología y Genética Forense Regional Noroccidente^(2,3).

De ahí que sea una ventaja realizar la transferencia del método para certificar que sus protocolos y procedimientos estén acorde con los equipos, instrumentos y condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa), garantizando que es posible obtener resultados confiables, precisos, reproducibles y con la misma sensibilidad que la reportada en los estudios anteriores; o por el contrario si estos mismos factores influyen negativamente en el desarrollo de la técnica y la misma no puede ser utilizada por sus condiciones de altitud y latitud. Por

ello el objetivo de este estudio es realizar la transferencia del método de inmunocromatografía para determinación de sangre humana con el kit Rapidsignal Occult Blood Casete de la firma Orgenics validado en el Laboratorio de Biología Forense de Bogotá ^(1,12,13,14), utilizando muestras de sangre en concentraciones conocidas preparadas en el Laboratorio de Biología y Genética Forense de la Regional Noroccidente de Medellín.

Metodología

Tipo de estudio: Estudio experimental.

Muestra

Manchas de sangre en soporte de tela garza estéril y muestras líquidas

de sangre un individuo donadas por el Hospital Universitario San Vicente de Paúl con los respectivos certificados de no infecciosas y consentimiento informado debidamente diligenciados. Todas las muestras fueron procesadas en condiciones que garantizaran su integridad y evitaran la contaminación con otro tipo de muestra biológica, para ello se usaron cabinas de flujo laminar, material nuevo y estéril y los analistas usaron los elementos de protección personal necesarios, guantes, bata, gorros y tapabocas desechables y haciendo en todos los procesos controles positivos y negativos. Todas las muestras durante los experimentos fueron procesadas por dos analistas y cada uno de ellos los procesó por triplicado.

Limite de detección

Los valores correspondientes a los límites de detección fueron definidos basados en las pruebas preliminares, sustentadas en los estudios de validación existentes en el Laboratorio de Biología Forense de la Regional Noroccidente y la Regional Bogotá^(9,10).

Para el desarrollo de los diferentes experimentos, se elaboraron diez diluciones (1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.00, 1:200.000, 1:500.000, 1:1'000.000, 1:10`000.000) para las manchas de sangre y para la sangre líquida, las cuales fueron procesadas por triplicado por cada analista. Las manchas de sangre se realizaron en tela garza estéril con dimensiones de 2cm x 2cm y a partir de estas se cortaron fragmentos de 5mm x 5mm con tijeras y pinzas previamente desinfectadas en hipoclorito durante

20 segundos, luego se sumergieron en agua destilada para retirar posibles residuos y así garantizar la desinfección entre muestra y muestra.

Ensayo de Inmunocromatografía

Los fragmentos de las manchas se diluyeron en el buffer tris según las recomendaciones del fabricante, se realizó agitación con vórtex y se dejaron en reposo durante 30 minutos para que el buffer actuara. Luego se depositaron dos gotas de la muestra en el pozo del casete correspondiente a cada dilución, se esperó entre 5 y 10 minutos para la lectura de los resultados^(1,9), debido a que la reacción después de 10 minutos se torna positiva en los casetes con resultado negativo. El procedimiento se realizó acorde a lo establecido en

el procedimiento estandarizado de trabajo ⁽¹²⁾.

Durante el desarrollo de los experimentos se registraron las condiciones ambientales, como son temperatura y humedad relativa en un termohigrómetro calibrado.

Se considera una prueba positiva la aparición de dos bandas de color púrpura en la ventana del casete y negativa cuando solo aparece una banda, prueba invalida cuando se da el efecto prozona, nótese que hay presencia de analito sin embargo no se da la reacción esperada ^(1,9).

Controles

En todos los ensayos realizados se procesaron los controles positivos y negativos para garantizar la veracidad de los resultados. El control positivo corresponde a una muestra de sangre humana que ha sido empleada en el laboratorio de

Biología y Genética Forense del INML y CF Regional Noroccidente Seccional Medellín y el control negativo a buffer sin adicionarle muestra.

Parámetros evaluados

Se valoró límite de detección, repetibilidad y la reproducibilidad. El procedimiento de las muestras fue realizado por dos analistas siguiendo los lineamientos del fabricante con el fin de evaluar la repetibilidad (índice de concordancia) y la reproducibilidad la cual se midió realizando los procedimientos por triplicado por cada uno de los analistas (índice Kappa). ^(5,6)

Resultados

En un total de 120 análisis de inmunocromatografía, 60

corresponden a diluciones de manchas de sangre y 60 a diluciones de sangre líquida, 60 muestras fueron positivas para sangre humana (30 de sangre líquida y 30 de mancha de sangre), 54 negativas (24 de sangre líquida y 30 de mancha de sangre) y 6 presentaron falsos negativos (fenómeno prozona) (3 de sangre líquida y 3 de mancha de sangre).

El límite de detección para muestras de sangre líquida fue de 1:100.000 (Figura 1), a partir de la dilución 1:200.000 las muestras fueron negativas. Se encontró un hallazgo importante no contemplado el procedimiento estandarizado de trabajo y en las instrucciones del fabricante, en la sangre líquida la dilución 1:10 presentó fenómeno prozona para los dos analistas.

En las manchas de sangre diluidas se encontró un límite de detección de

1:10.000 (Figura 2), a partir de la dilución 1:200.000 las muestras fueron negativas, aspecto importante debido a que la mayoría de las muestras que llegan al Laboratorio de Biología y Genética Forense del INML y CF de Medellín son manchas sobre diferentes soportes.

Los ensayos realizados por los dos analistas en diferentes momentos, bajo condiciones de temperatura y humedad similares no influyeron ni modificaron en ningún momento los resultados. Se encontró un índice de Kappa de 0.90. La repetibilidad fue una variable trabajada por los dos analistas por triplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados, tanto en las diluciones de sangre, como en las manchas los resultados obtenidos fueron similares en un



Figura 1.
Inmunocromatografía a partir de sangre líquida. Resultado representativo a partir de sangre líquida, se observa el fenómeno de prozona en la dilución 1:10. Las diluciones 1:200.000 hasta 1:10'000.000 son negativas, el límite de detección es de 1:100.000.



Figura 2.
Inmunocromatografía a partir de mancha de sangre: Resultado representativo a partir de mancha de sangre, no se presenta el fenómeno de prozona. Las diluciones 1:200.000 hasta 1:10'000.000 son negativas.

Discusión

En este estudio se realizó la transferencia del método de inmunocromatografía del kit Rapid Signal Occult Blood de la marca Organics para determinación de sangre humana en manchas de interés forense, demostrando que es una prueba rápida, fácil y de bajo costo, no requiere de equipos costosos, ni de entrenamiento especial^(3,9,12).

En las seis muestras (dilución 1:10 de sangre) con resultado falso negativo se presentó el efecto prozona para las diluciones en sangre, fenómeno que se presenta cuando se está ante concentraciones muy elevadas de antígeno en la muestra del paciente que se unen a todos los sitios disponibles saturándolos y evitando la reacción.^(1,2,12)

En concentraciones altas se observa el “gancho” en la curva de respuesta a la reacción señal versus la concentración de analito ^(8,9,12).

Con los ensayos realizados se pudo demostrar una fuerte concordancia entre los dos analistas, sin embargo, hay que tener en cuenta que las evidencias llegan en distintos soportes y telas por lo que los resultados pueden variar, teniendo en cuenta que este experimento se realizó sólo en soporte de tela garza estéril de acuerdo a los Procedimientos Estandarizados de Trabajo . ⁽¹²⁾.

La repetibilidad de los ensayos fue del 100%, aunque una muestra dio un positivo muy débil en la dilución 1:10.000 para mancha de sangre, lo que puede deberse a que el resultado estuvo cerca al límite de detección,

esto se explica porque en las mediciones cualitativas existe un umbral de concentración por el cual la especificidad se vuelve poco confiable, este umbral puede variar si el experimento se repite en otro tiempo y en condiciones diferentes ^(13,7) ^(13,7), sin embargo, el resultado obtenido con esta medida, sustenta ampliamente la elevada confiabilidad del uso del kit Rapid Signal Occult Blood – Casete, en el Laboratorio de Biología del INML y CF, para análisis de manchas de sangre, por tanto los resultados obtenidos bajo la misma metodología, realizada con el mismo kit, y ejecutada por el mismo operador, no mostraron diferencia alguna entre los resultados originales y su respectiva repetición, manteniendo identidad en cada uno de los resultados de las muestras y brindando de esta manera seguridad para su uso ^(2,3,7).

Por otro lado se halló un límite de detección en manchas para Orgenics similar al detectado por “ABACard Hema Trace for the forensic identification of human blood”, aunque este último es específico para uso forense y el kit de Orgenics es para detección de sangre humana en materia fecal ^(1, 9,12).

Conclusiones:

Con los resultados obtenidos de la transferencia se concluye que la prueba Rapid Signal Occult Blood es una alternativa como prueba de confirmación de la presencia de sangre en las condiciones presentes en el Laboratorio de Biología y Genética Forense del INML y CF de Medellín.

La transferencia del método analítico demostró ser una alternativa para ser implementada en los laboratorios de Biología y Genética Forense, este garantiza la confiabilidad de sus análisis y resultados, su bajo costo y facilidad de realizar los ensayos por haber una previa validación del método a transferir, lo que permite el ahorro de tiempo, recursos económicos y técnicos ^(2,3,13).

Finalmente, la transferencia del método analítico por su repetibilidad, reproducibilidad y límite de detección, es una opción para determinar la presencia de sangre en manchas en este proceso tan importante dentro de una investigación en donde se requiere analistas de pruebas preliminares, rápidas, económicas y fáciles de utilizar.

Referencias Bibliográficas

1. Abacus diagnostics Inc. ABACard Hema Trace for the forensic identification of human blood. Immunoassay for the qualitative detection of human blood at crime scenes and in forensic laboratories.
2. GILSBERT Calabug JA. Medicina Legal y Toxicológica. Capítulo XIV. Editorial Ediciones científicas y técnicas S.A., Cuarta edición, 1991.
3. ARBELÁEZ, M. Luisa Fernanda y Ríos H. Linda Sorieth. Validación de los métodos Bluestar forensics free y Thevenon Roland- Piramidón como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense. LBIF- INML y CF, Bogotá 2009.
4. Código Penal Colombiano. Editorial Legis. 2000.
5. Manual de Biología Forense. Curso Básico de serología. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
6. MANRIQUE Rubén. Manual de referencia para la validación de técnicas analíticas. Medellín-Colombia. 1995
7. PÉREZ, Juan Alberto. Álvarez, Enrique. Giraldo, Isabel. Detección de hemoglobina en heces. Publicado: 06-17-2011. Citado: 06-01 2012. <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt113c.pdf>.
8. Manual de Biología Forense. Curso Básico de serología. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. 1999.
9. TURRINA, G. Filippini, R. Atzei, E. Zaglia, D. De Leo, Validation studies of rapid stain identification-blood (RSID-blood) kit in forensic caseworks, Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1 (2008) 74–75.
10. DELGADO, Eliana y Ballén, Victoria. Validación de una técnica inmunocromatográfica para la detección de sangre humana en manchas de interés forense en el Laboratorio de Biología del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Bogotá, empleando el kit Rapid Signal Occult Blood-Casete, de la firma Orgenics.
11. PINZÓN, Aideé. Procedimiento verificación, modificación y transferencia de métodos analíticos en los Laboratorios del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Código: DG-DG-M-P-23, versión 1.2011. Bogotá-Colombia.
12. CIFUENTES, V Liliana. Procedimiento Estandarizado de Trabajo: Determinación de sangre humana por inmunocromatografía. Código: GG-M-PET-09 versión 1, 2011. Bogotá- Colombia.
13. PINZÓN, Aideé. Procedimiento verificación, modificación y transferencia de métodos analíticos en los Laboratorios del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Código: DG-DG-M-P-23, versión 1.2011. Bogotá-Colombia
14. ISO-IEC-17025-2005. Disponible: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es>

