

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

MANUAL DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS EN HEMATOLOGÍA
FORENSE

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RAYMUNDO GARCÍA MARTÍNEZ

ASESOR: M. en C. LEONOR AGUILAR SANTELISES

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En este presente trabajo se propone un Manual de Técnicas Serológicas en Hematología Forense, el cual pretende ser una revisión de procedimientos y técnicas que se requieren al trabajar con una muestra de sangre obtenida en el lugar donde se sucedió algún delito.

Este manual servirá como referencia rápida para el trabajo rutinario del área de hematología en el laboratorio de química forense, tanto en la toma de muestra como su análisis.

A manera de introducción, se presenta un resumen sobre lo que es la sangre, en ella se menciona la importancia que tiene en el ser humano así como las funciones que desempeña en el organismo y la composición de esta.

También se hace una revisión de la forma en la cual se debe tomar una muestra y la importancia de hacerlo adecuadamente en el lugar de los hechos donde se ha cometido algún delito, así como en el embalaje y envío de los indicios hacia el laboratorio para los estudios posteriores.

Se describen las técnicas más utilizadas en un laboratorio de química forense para la identificación de la sangre, además de identificar si la mancha es o no de sangre, si es de animal o humano, a que grupo sanguíneo pertenece y si es posible identificar a que persona pertenece.

Es de importancia tener en cuenta que toda técnica de orientación requiere del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a la de la sangre o bien con otros materiales.

ÍNDICE

	Pag.
I. Marco teórico	1
II. Técnicas de Orientación para la identificación de sangre	11
<i>1. Técnica de la Bencidina o de Adler</i>	11
<i>2. Técnica de la Fenolftaleína o de Kastle-Mayer</i>	13
<i>3. Técnica de la Leuco Malaquita Verde (Ensayo de Pierre Médinger)</i>	15
<i>4. Técnicas espectroscópicas</i>	16
<i>5. Técnica de Luminol</i>	18
III. Técnicas de Confirmación	19
<i>1. Cristales de clorhidrato de hematina o hemina o de Teichman (Ensayo microcristaligráfico)</i>	19
<i>2. Prueba de Takayama (Hemocromógeno)</i>	21
IV. Determinación del Grupo Sanguíneo en sangre fresca con fines forenses	23
<i>1. Recolección y preparación de las muestras sujetas a estudio</i>	20
<i>2. Determinación del Grupo en Tubo</i>	24
<i>3. Determinación del Grupo en placa</i>	25
<i>4. Determinación del Grupo Sanguíneo en Manchas de Sangre Fresca</i>	25
V. Técnica de absorción-elución para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre	27
Conclusiones	30
Bibliografía	31

I. MARCO TEÓRICO

LA SANGRE

La sangre se compone de un líquido denominado plasma y elementos celulares, entre los cuales se encuentran leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Un adulto normal tiene alrededor de seis litros de este líquido vital, el cual representa de 7 a 8% del peso corporal total. El plasma constituye casi 55% del volumen sanguíneo, mientras que 45% está compuesto de eritrocitos y 1% se forma de leucocitos y trombocitos. Con frecuencia, las variaciones en estos elementos sanguíneos son el primer signo de enfermedad que se presenta en tejidos corporales. Los cambios en el tejido enfermo logran detectarse de manera frecuente mediante análisis de laboratorio que identifican las alteraciones sobre la base de valores normales en los diversos constituyentes de la sangre.

El componente más importante del plasma es el agua, la cual contiene iones disueltos, proteínas, carbohidratos, grasas, hormonas, vitaminas y enzimas. Los principales iones necesarios para una función celular normal incluyen calcio, sodio, potasio, cloro, magnesio e hidrógeno. La proteína principal que constituye al plasma es la albúmina, la cual es el componente más importante para conservar la presión osmótica; la albúmina actúa también como una molécula transportadora, llevando compuestos como bilirrubina y hem; otras proteínas sanguíneas transportan vitaminas, minerales y lípidos. Las inmunoglobulinas y el complemento son proteínas sanguíneas especializadas que participan en la respuesta inmunitaria. Las proteínas de la coagulación, encargadas de mantener una hemostasia normal, circulan en la sangre como enzimas inactivas hasta que se les requiere para el proceso de la coagulación. Un desequilibrio en los elementos disueltos en el plasma puede ser causa de alguna enfermedad en otros tejidos corporales.

El plasma sanguíneo también interviene como un medio de transporte para los nutrientes celulares y metabolitos; por ejemplo, las hormonas elaboradas en un tejido son transportadas por la sangre hacia los tejidos blanco en otras partes del cuerpo; la bilirrubina (el principal residuo catabólico de la hemoglobina) es transportada por la albúmina desde el bazo hasta el hígado para su excreción; el nitrógeno ureico sanguíneo es conducido hacia el riñón para ser filtrado y excretado. El aumento en la concentración de estos catabólicos normales, puede indicar metabolismo celular aumentado o un defecto en el órgano responsable de su excreción.

Por ejemplo, en enfermedad hepática aumentan las concentraciones de bilirrubina, e indica enfermedad del órgano terminal; sin embargo, en la anemia hemolítica suele aumentar la concentración de bilirrubina no por enfermedad hepática, sino debido a un catabolismo aumentado de la hemoglobina.

Cuando las células corporales mueren, liberan sus componentes celulares hacia el tejido circundante; finalmente, algunos de estos elementos llegan a la sangre; muchos son específicos para la función particular de la célula; por tanto, una concentración aumentada de ellos, en especial las enzimas, puede indicar destrucción celular anormal en algún órgano específico.

Cada uno de los tres elementos celulares de la sangre tiene funciones específicas. Los eritrocitos contienen una proteína vital, la hemoglobina, que se encarga del transporte de oxígeno y bióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales. Los leucocitos (de los cuales existen cinco tipos) defienden al organismo contra antígenos extraños como bacterias y virus. Las plaquetas son necesarias para mantener la hemostasia. Las células sanguíneas distribuidas en todos los tejidos corporales. Los eritrocitos y las plaquetas desarrollan sus funciones sin abandonar los vasos; pero los leucocitos, mediante diapédesis (pasan a través de las paredes de los vasos) llegan a tejidos donde protegen contra antígenos extraños invasores. Básicamente la hematología es el estudio de estos elementos celulares sanguíneos.

HEMATOPOYESIS: (Hemat = sangre; poyesis = formación) es el término utilizado para describir la formación y desarrollo de las células sanguíneas. La diferenciación, proliferación y maduración de dichas células se lleva a cabo en el tejido hematopoyético, el cual se encuentra principalmente en la médula ósea. Sólo las células maduras son liberadas hacia la sangre periférica.

La hematopoyesis comienza en el saco vitelino del embrión humano desde el decimonoveno día después de la fertilización. Cerca del tercer mes de vida embrionaria, el hígado fetal se convierte en el principal sitio de producción de células sanguíneas, mientras que el saco vitelino termina su participación en el proceso hematopoyético. En este momento, la hematopoyesis se inicia también, en menor grado, en bazo, riñón, timo y ganglios linfáticos. Estos últimos se mantienen como un sitio importante de linfopoyesis a través de la vida; sin embargo, la producción de células sanguíneas en hígado, bazo, riñón y timo disminuye o termina cuando la médula ósea interviene activamente en el proceso. La médula ósea se convierte en el principal sitio de hematopoyesis en el tercer trimestre de la gestación; se mantiene como la principal fuente de producción sanguínea después del nacimiento y durante la vida adulta.

¿Qué funciones cumple la sangre?

La sangre lleva al cuerpo lo siguiente:

- Transporta nutrientes.
- Transporta productos residuales
- Transporta oxígeno y desecha CO₂
- Transporta hormonas
- Mantiene la presión osmótica en ella y en los tejidos
- Participa en el equilibrio ácido-base del organismo
- Regula la temperatura
- Participa en la defensa del organismo

Son cuatro los puntos cardinales que encierra la problemática de la hematología forense:

1. ¿Una mancha es o no de sangre?
2. En caso de serlo ¿cuál es su origen: humano o animal?
3. ¿A que grupo sanguíneo pertenece?
4. ¿De que persona es?

Para contestarlas hay que realizar pruebas orientativas para verificar.

La sangre es uno de los tipos más comunes de pruebas físicas que suelen encontrarse en el escenario de un delito de violencia. Cuando dicha prueba es debidamente analizada y relacionada puede producir indicios que en la investigación podrán tener un importante impacto.

La Criminalística de Campo es la disciplina que emplea diferentes métodos y técnicas con el fin de observar, fijar, proteger y conservar el lugar de los hechos. También se encarga de la colección y embalaje de los indicios relacionados con los hechos que se investiga, para posteriormente realizar un examen minucioso.

El Criminalística de Laboratorio utiliza todos los métodos y técnicas de laboratorio para el estudio, análisis e identificación de los indicios y evidencias encontrados en el lugar del hecho o del hallazgo.

Los laboratorios forenses están organizados dependiendo del potencial económico del país, así como de sus necesidades, pero siempre considerando que cada evidencia encontrada en el lugar del hecho requerirá su traslado al laboratorio para su estudio con el propósito de lograr su identificación, clasificación, comparación y su relación con el hecho.

Por lo que será necesario contar con áreas específicas, personal altamente calificado y equipo moderno para aportar elementos suficientemente científicos en la investigación.

LUGAR DE LOS HECHOS Y DEL HALLAZGO

Lugar de los hechos. Es aquel espacio o área en el cual vamos a localizar aquel material sensible significativo o indicio, que por sus características, situación, ubicación y consistencia nos indica que ahí, en ese lugar se desarrollo una conducta probablemente delictuosa.

Para complementar idóneamente los conceptos que se apuntan, también se debe recordar la definición exacta del lugar de los hechos; es la siguiente: “El sitio donde se ha cometido un hecho que puede ser delito”.

En concordancia con esta idea, se deriva que el lugar de los hechos no tiene por qué ser único.

Se denomina lugar de los hechos primario al lugar donde se encuentra el cadáver, ya que suele ser donde se inicia la investigación.

Sin embargo puede haber dos o más lugares de hechos, denominados secundarios, y suelen estar en relación a:

- Lugar desde donde se trasladó el cadáver
- Lugar donde se produjo el ataque
- Lugar donde falleció la víctima
- Lugar donde se descubre cualquier indicio
- Vehículo usado para transportar el cuerpo
- Ruta de huída

Lugar del hallazgo. Es aquel espacio o área en el cual vamos a localizar aquel material sensible significativo o indicio, que por sus características, situación, ubicación y consistencia nos indica que ahí, en ese lugar se desarrollo una conducta probablemente delictuosa y que puede o no estar relacionado con el hecho -por ejemplo el hallazgo de un cadáver-, pero este sitio no va a corresponder al lugar donde sucedió el presunto hecho delictuoso.

ACCIONES PARA EL ASEGURAMIENTO DE LOS INDICIOS

Tras ser reconocido, todo indicio debe ser adecuadamente documentado, levantado, recolectado, empaquetado y preservado:

- Si no es adecuadamente documentado su origen puede ser cuestionado.
- Si no es recolectado correctamente, su actividad biológica se puede perder.
- Si es incorrectamente empaquetado puede haber contaminación cruzada.
- Si no es adecuadamente preservado, su degradación y descomposición puede afectar el estudio.

Formulario de Envío

- **Tipo de solicitud:** Química, hematología, genética, etc.
- **Antecedentes y datos de interés sobre el caso:** Causa, lugar, fecha, existe algún cadáver?
- **Datos de la(s) víctima(s):** Edad, Sexo, Causas, Relaciones
- **Datos del(los) sospechoso(s):** Edad, Sexo, Lesiones, etc.

RECOLECCIÓN, EMBALAJE Y ENVÍO

Durante la recolección, conservación y envío, debe evitarse la contaminación, ya que cualquier material orgánico procedente de los manipuladores puede imposibilitar el estudio. En este sentido deben seguirse las siguientes normas generales:

- Procurar las máximas condiciones de esterilidad, usando guantes, cubre zapatos si se entra en el lugar de los hechos e instrumentos esterilizados o limpios.

- Volver a limpiar y exponer al fuego por tres minutos como mínimo si es posible el instrumento utilizado, o utilizar un nuevo instrumento para recoger un indicio diferente. En cada caso en que se estén utilizando guantes, cambiarlos si éstos tienen contacto con los indicios.
- Usar diferentes recipientes para cada indicio, aunque hayan sido recolectados en lugares muy próximos o estuviesen juntos.
- Etiquetar perfectamente cada uno de los recipientes haciendo referencia al menos la fecha, hora, identificación de la víctima, localización del indicio, tipo de indicio y número del mismo, nombre de la persona que recolecta y referencia legal del caso.
- Enviar lo más rápido posible al laboratorio, asegurando que las muestras que lo necesiten lo hagan en las condiciones adecuadas.
- Es fundamental y básico tomar muestras testigo de la víctima o probable responsable, así como del lugar de los hechos (testigo negativo).
- Tomar la filiación de todas las personas que han intervenido o colaborado en la recolección de las muestras por si se produce algún problema de contaminación cruzada.

Estas normas generales se complementarán con aquellas que son específicas a determinadas muestras biológicas y a su forma de presentación.

RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez que el lugar de los hechos ha sido totalmente documentado y se ha localizado la evidencia, se podrá empezar el proceso de colección. El proceso de colección usualmente inicia con la evidencia más frágil o más fácil de perder. Se debe tener una consideración especial con los objetos o evidencias que requieren ser movidos.

Las evidencia biológicas son transferidas por vía directa o secundaria, estas quedan sobre superficies por absorción o adherencia. En general, las muestras líquidas son absorbidas dentro de las superficies y las evidencias sólidas se adhieren a las superficies. El método de recolección depende ampliamente del estado líquido o sólido y de las condiciones de la evidencia.

SANGRE. Las muestras de sangre nunca deben ser expuestas a calor o a humedad excesiva.

Ésta puede recolectada en un papel filtro especial llamado FTA.

Siempre tomar precauciones de seguridad cuando se estén manipulando muestras biológicas, se deberá usar ropa protectora, guantes, máscaras o lentes protectores según la situación.

MUESTRAS DE SANGRE LÍQUIDA EN UN INDIVIDUO

- La sangre líquida de una persona debe ser colectada por personal calificado.
- Recolectar sangre en 1 tubo vacutainer de aproximadamente 5 mL, con EDTA como anticoagulante.
- Cada tubo debe ser etiquetado con la fecha, hora, nombre del colector, lugar, número de caso y averiguación previa.
- Las muestras de sangre deben ser refrigeradas (no congeladas).
- Enviarlas al laboratorio tan pronto como sea posible.

MUESTRAS DE SANGRE LÍQUIDA EN EL LUGAR DE LOS HECHOS

- La sangre líquida debe ser colectada con una pipeta desechable (preferiblemente estéril) y transferida a un tubo de ensaye limpio (preferiblemente estéril).
- Un coágulo de sangre puede ser transferido a un tubo de ensaye limpio con una espátula limpia.
- Un filtro de FTA puede ser usado para absorber sangre líquida o sangre coagulada (evitando áreas que contengan suero únicamente).
- Etiquetar las muestras con número de caso, número de artículo, fecha, hora, lugar y nombre del colector número de caso.
- Si se colectan muestras líquidas, se deben preservar en un anticoagulante adecuado y mantener en un refrigerador. Estas muestras se deben llevar al laboratorio tan pronto como sea posible.

LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS

Con la realización de análisis químicos y exámenes microscópicos, se puede identificar si la sangre problema es humana o de animal; asimismo se determinan grupos sanguíneos.

Los análisis y exámenes de la sangre están sujetos a ciertas limitaciones:

- a) No es posible identificar sangre humana como procedente de una persona en particular, salvo que sea de una estructura muy individual.
- b) Con el análisis de sangre, no se puede determinar el sexo o raza de una persona.
- c) Tampoco la época en que se produjo la mancha o huella en cuestión.

COLECCIÓN DE LAS MANCHAS DE SANGRE

En la colección de indicios y tratándose de muestras de sangre, al recogerla del lugar de los hechos, de la víctima o del victimario, se debe observar lo siguiente:

- a) Si las manchas o huellas de sangre se encuentran en ropas o telas. Deben transportarse cuidadosamente embaladas al laboratorio, evitando su contaminación.
- b) Cuando las manchas o huellas de sangre, proceden de fuentes diferentes, pero del mismo escenario del hecho, deben ser embaladas por separado y etiquetadas señalando el lugar preciso de donde fueron recogidas.
- c) Las manchas frescas existentes en ropas, telas o tejidos, antes de embalarlas deben ser expuestas a secar o de lo contrario entrarán en proceso de putrefacción.
- d) Para secar las manchas de sangre frescas, las ropas de que se habla, deben ser puestas a secar en una atmósfera ventilada que no esté expuesta al sol o calor.

UTILIDAD DE LAS MANCHAS DE SANGRE

Las huellas producidas por la sangre, con características de apoyo, embarramiento, estáticas, dinámicas, escurrimientos, etc., son las que más frecuentemente se encuentran en delitos contra las personas y constituyen el indicio más constante en el crimen, debiendo observar lo siguiente:

- a) Ofrecen posibilidades de reconstrucción del mecanismo de los hechos.
- b) Una vez manchado determinado soporte, la sangre permanece durante un tiempo prolongado y se encuentra con más facilidad en aquellos lugares que le ofrecen mejor superficie para su adherencia.
- c) Estas superficies pueden ser: la piel del cuerpo humano, ropas, muros de tabique o madera, muebles, cortinas, pisos de cemento o madera, linóleums, alfombras, etc.
- d) Mientras que difícilmente permanecen en superficies poco adherentes, como: metales, cristales, porcelana, superficies pulidas, enceradas o barnizadas.

EL RASTREO HEMATOLÓGICO

En el rastreo hematológico que se efectúa en el lugar de los hechos, se debe observar con sumo cuidado, pues existen algunas manchas que son visibles a simple vista, pero hay otras que no lo son, y para dar luz a lo anterior, se realiza un examen metódico del sitio:

- a) Utilizando primero el auxilio de la luz artificial, proyectada en forma rasante u oblicua a la superficie por observar, y de ser posible con la ayuda de filtros coloreados que permiten aumentar el contraste entre la mancha y el soporte.
- b) También se puede utilizar la luz ultravioleta en completa oscuridad, que brinda mejores ventajas para efectuar un rastreo hemático o de otro tipo de manchas.

c) El color del soporte donde se encuentra la mancha o huella de sangre, facilita o dificulta su localización.

Las manchas de sangre encontradas en el lugar del delito o en la ropa del sospechoso pueden ser fuente de información importante para el investigador. Tanto el número de manchas, como su posición relativa y la forma que éstas tengan, puede indicarle al investigador cuál podrá haber sido la posición del atacante, la manera en que el arma se utilizó y el lugar exacto del ataque.

Las cosas manchadas de sangre, tales como los picaportes de las puertas, muebles, etc., también le permiten al investigador rastrear los movimientos de la víctima o del atacante y le dan información valiosa para reconstruir el curso de los hechos.

LA SANGRE EN EL LUGAR DE LOS HECHOS

En el lugar de los hechos, la cantidad y características de la sangre que se observe alrededor de la víctima, pueden indicar el tiempo probable que sobrevivió después de haber sido lesionado, y se debe tener cuidado con lo siguiente:

a) Algunas lesiones por su ubicación y por la posición del cuerpo, pueden ser tales que la acción de la gravedad haga que la sangre siga emanando hasta acumularse en gran cantidad sobre el piso o soporte que reciba a la víctima, interviniendo en algunos casos el declive del piso.

b) Se debe observar también que la sangre *ante mortem* se coagula entre 5 y 8 minutos después de expuesta fuera del cuerpo humano, y no así la de *postmortem* que expuesta al exterior no origina el proceso de coagulación.

El investigador deberá tener presente las siguientes posibilidades significativas en lo que se refiere a la sangre o a las manchas de sangre que se encuentran en el lugar del delito o en la persona del sospechoso:

1. Las manchas de sangre, frescas o secas, representan evidencia pertinente –real y circunstancial- que pueden proporcionar información importante para la investigación y para solucionar el caso.

2. La sangre que se encuentre en el lugar del delito y que se detecta en la ropa del sospechoso puede servir para fines de identificación.

3. Al examinar huellas de sangre en el lugar del crimen, muchas veces se encuentran otras pruebas físicas importantes, como impresiones de talones o tacones, basura que no es común de la localidad precisa de que se trate, pelos y fibras, y –en algunas raras ocasiones- impresiones identificables de la palma de una mano o de huellas digitales que se encuentran en las mismas manchas de sangre.

4. Cuando la sangre encontrada en el lugar del delito también se encuentra en algún instrumento en poder del sospechoso, ésta será una prueba real y circunstancial relevante para ligar al sospechoso con el instrumento con el que cometió el crimen.

5. Las pruebas compuestas por manchas de sangre pueden ser eslabones importantes en una cadena de evidencia que se reúne para probar un cargo de homicidio, de violación, de asalto con agravio, o de otro tipo de delito.

6. Cuando las manchas de sangre son debidamente presentadas como prueba de un delito, se puede lograr disipar cualquier duda que surja en el tribunal concerniente a pruebas testimoniales.

7. La prueba de manchas de sangre, cuidadosamente recogida y extensamente analizada en el laboratorio, puede establecer la corroboración necesaria que caracterice al sospechoso como perpetrador del delito.

Las manchas de sangre pueden tener distintos matices; por otra parte hay manchas fácilmente confundibles con las producidas por la sangre. Es común creer que manchas de pintura, de lápiz de labios y algunas similares, son de sangre. No es suficiente la comprobación visual; el investigador debe aplicar una serie de pruebas que le permitan comprobar el origen de la mancha. Su importancia radica en que la sustancia sometida a prueba puede, en efecto, ser sangre o no serlo. Pruebas de campo como la bencídina, la leucomalaquita y la prueba de luminol son pruebas de una gran sensibilidad y pueden aplicarse sin que para ello se requiera una gran cantidad de sangre.

Es necesario que se recojan muestras de sangre o manchas de sangre ya secas para ser llevadas al laboratorio de criminalística. Lo ideal es tomar posesión del objeto en el cual se han encontrado las manchas de sangre.

El estudio forense de manchas de sangre plantea dos problemas igualmente importantes: uno desde el punto de vista de la Criminalística de campo, con fines reconstructivos de un hecho delictuoso; el segundo, identificativo, que resuelve la inmunohematología forense.

a) Para resolver el primero, se atiende a la morfología de las manchas en el sitio del ilícito, indicándonos los movimientos de la víctima y/o del victimario.

Al llegar al lugar de los hechos, que deberá preservarse para conservar su originalidad, se fijará, siguiendo la metodología criminalística rutinaria, para poder, después de la observación, efectuar una interpretación correcta de la dinámica del hecho; fijación que deberá seguir los siguientes pasos:

1. Tomar las fotografías necesarias, desde diferentes ángulos.

2. Describir la escena con claridad y sencillez, tomando medidas que se relacionarán con las paredes o puertas, nunca con objetos móviles.

Dibujar un croquis sencillo

b) La metodología criminalística utilizada en la identificación de la sangre, es acorde al método científico, esto es, la comprobación de la hipótesis de trabajo, mediante la experimentación que en este caso se logra a través de las siguientes técnicas:

1. Técnicas de Orientación

- a) Reacción de la bencídina.
- b) Reacción de la fenolfatleína reducida.
- c) Reacción de la leuco malaquita verde.
- d) Técnicas espectroscópicas.
- e) Técnica de luminol, para detectar manchas lavadas y/o decoloradas

2. Técnicas de Confirmación

- a) Cristales de hemina.
- b) Cristales de hemocromógeno.

3. Técnicas para Determinar el Origen de la Sangre

- a) Reacción de las precipitinas en capilar.
- b) Inmunoelectroforesis cruzadas.

4. Determinación del Grupo Sanguíneo

- a) En sangre fresca
- b) En manchas de sangre fresca.

5. Técnica de absorción-elución para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre

II. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE

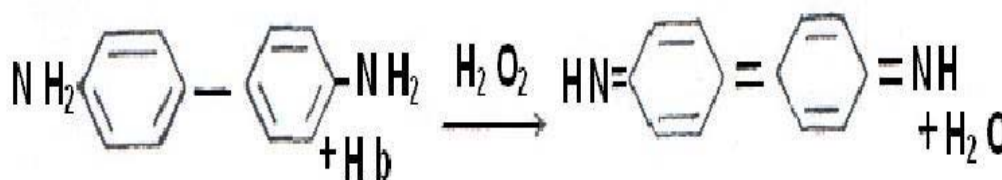
1. Técnica de la Bencidina o de Adler

1.1. Fundamento Químico

Las peroxidases sanguíneas son catalasa que, como su nombre indica, poseen actividad catalítica (enzimática) en las reacciones de oxidación, ya que tienen la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, produciendo liberación de radicales oxidrilo según la siguiente reacción:



El grupo hem de la hemoglobina posee esa actividad enzimática, que puede catalizar la ruptura del peróxido de hidrógeno. Mientras no estén presentes otras sustancias orgánicas oxidantes, esta actividad de la hemoglobina, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, que al reaccionar con la bencidina la oxidarán formando un compuesto intensamente azul.



Bencidina reducida

Bencidina azul reducida

La bencidina, al oxidarse por acción del agua oxigenada activada, origina un derivado de color azul (azul de bencidina).

La oxidación de la bencidina es utilizada como prueba presuntiva para la identificación de sangre. La técnica tiene una sensibilidad de 1 300 000 a 500 000.

Un resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica de orientación, del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a la de las peroxidases o bien con otros materiales oxidantes:

Plantas	Productos biológicos	Otras sustancias
Manzanas	Médula ósea	Herrumbe
Albaricoque	Leucocitos	Formol
Espárragos	Tejido cerebral	Estiércol
Frijol	Líquido espinal	Sulfato de cobre
Acelgas	Intestino	Dicromatos
Remolacha	Hígado	Permanganato de potasio
Zarzamora	Pulmón	Algunos blanqueadores
Alcachofa	Saliva	
Papa	Moco	
Nabo	Pus	

1.2. Preparación del Reactivo

a) Solución de Bencidina

0.25g de bencidina se disuelven en 175mL de etanol y se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial. Se guarda en un frasco gotero ámbar, en refrigeración en tanto se usa.

b) H₂O₂ al 3%; también en frasco gotero ámbar.

1.3. Procedimiento:

Humedecer un hisopo con H₂O destilada y frotarlo sobre la mancha problema.

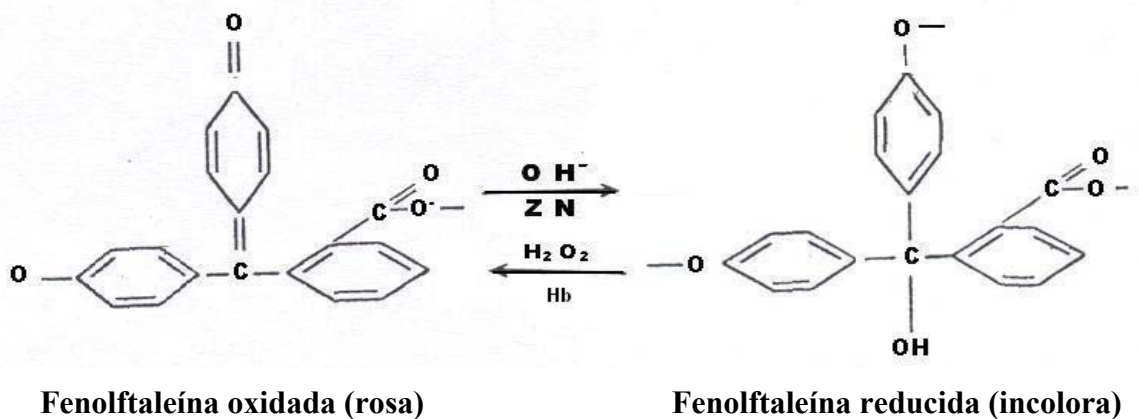
Añadir al hisopo 1 o 2 gotas de solución de bencidina, después de unos momentos de observar que no de coloración con ésta, poner la misma cantidad de H₂O₂ sobre el hisopo.

En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul.

2. Técnica de la Fenolftaleína o de Kastle-Mayer

2.1. Fundamento Químico

La fenolftaleína es un indicador que, en un medio alcalino (pH entre 8.2 y 10), presenta color rojo. Si se reduce la fenolftaleína, se decolora pero vuelve a adquirir color rojo sí, en presencia de agua oxigenada, existe un compuesto con cualidades catalíticas (sangre, en nuestro caso) que promueve la descomposición del oxidante.



La diferencia estriba en que:

- La fenolftaleína debe ser reducida previamente a fenolftaleína incolora y este reactivo, por su labilidad, debe ser guardado en refrigeración en frascos ámbar.
- Se trabaja en medio alcalino en vez de en medio ácido.
- Se efectuará un calentamiento previo a 100°C durante un minuto.

Se apuntará a continuación el comportamiento de las peroxidasas vegetales, que explicará el porqué de las modificaciones apuntadas:

Termolabilidad

Se ha confirmado que todas las peroxidasas vegetales se inactivan por calentamiento a 100°C. A la misma temperatura las peroxidasas de origen animal son estables. Un periodo corto de calentamiento (un minuto a 100°C) servirá para diferenciar una de otra.

Tiempo

Las peroxidasas de origen animal son muy estables; las manchas de sangre humana dan resultados positivos aún después de varios meses de haberse producido. Cuando manchas de la misma edad de origen vegetal son tratadas de esta manera, dan resultado negativo.

pH

Las peroxidasas de las plantas reaccionan en medio ácido, pero no en medio alcalino. Por esta razón, la técnica de Kastle-Mayer es más confiable. A pesar de esto deben efectuarse pruebas testigo sin añadir agua oxigenada a muestras previamente calentadas a 100°C; aún así, sigue siendo solamente una técnica presuntiva.

Esta técnica de la fenolftaleína reducida es más sensible que la de la bencidina, siendo esta sensibilidad de 1:1 000 000 a 10 000 000.

2.2. Preparación del Reactivo

a) Solución de fenolftaleína:

Fenolftaleína	2 g.
Hidróxido de potasio	20 g.
Agua destilada	100 al
Polvo de zinc	20 g.

Disolver estas sustancias y colocarlas a reflujo con el polvo de zinc hasta completa decoloración.

Calentar a ebullición suave hasta la decoloración total (el zinc, en un medio alcalino, reduce la fenolftaleína, de color rojo, a fenolftaleína, incolora); filtrar en caliente.

Esta solución madre deberá guardarse en un frasco ámbar en refrigeración y deberá añadirse polvo de zinc.

b) Solución de trabajo:

Diluir la solución madre en etanol en la proporción de 1:5; la que también deberá refrigerarse en tanto no se use.

c) Solución de agua oxigenada al 3%. (El agua oxigenada puede sustituirse por perborato de sodio, que se agrega al reactivo momentos antes de su empleo -a 10mL de reactivo, agregar 0.14g de perborato de sodio sólido)

2.3. Procedimiento:

Humedecer un hisopo con solución salina, frotar la muestra problema y pasarlo a un tubo de ensayo con 2ml. de la misma solución, calentar un minuto a 100°C, añadir unas gotas de reactivo, esperar unos segundos y agregar agua oxigenada. En caso positivo se obtendrá una coloración rosa brillante.

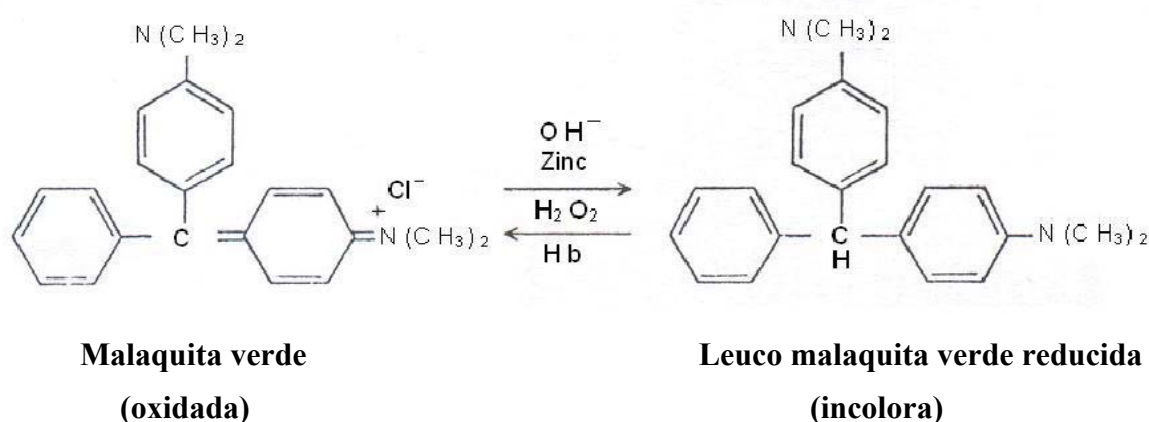
3. Técnica de la Leuco Malaquita Verde (Ensayo de Pierre Médinger)

3.1. Fundamento químico

La leuco-base del verde malaquita es oxidada por el agua oxigenada o por el perborato de sodio en presencia del hemo para originar el verde malaquita, de color intenso.

Se basa, al igual que las anteriores, en una reacción de oxidación y reducción.

La estructura química de esta sustancia recuerda a la de la fenolftaleína. El prefijo “leuco” se refiere a la forma reducida incolora; la forma leuco puede ser preparada por reducción de la malaquita verde.



Como en el caso de la fenolftaleína, la forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada verde. Esta técnica fue reportada por Huna, quien señala que la encontró más confiable para sangre, aunque menos sensible que la de la bencidina.

3.2. Preparación del reactivo:

- Se prepara una mezcla sólida que contenga: 0.32g de perborato de sodio y 0.10 g de malaquita verde; se mezclan perfectamente y se guardan en frasco ámbar. Esta mezcla dura un año sin perder su estabilidad.
- El solvente se prepara diluyendo 6.6mL de ácido acético glacial en 3.3mL de agua destilada.
- Preparar el reactivo de trabajo, inmediatamente antes de usarlo, disolviendo la mezcla sólida *a*) en la solución *b*. Si en el reactivo recién preparado llegara a observarse la más leve coloración verde, no deberá ser usado.

3.3. Procedimiento:

La mancha sospechosa, se levanta con un hisopo humedecido en agua destilada y se le agregan unas gotas del reactivo recientemente preparado.

En caso positivo se observará una coloración verde.

4. Técnicas espectroscópicas

Estas técnicas permiten poner de manifiesto, mediante espectros de absorción, la presencia de hemoglobina y/o de alguno de sus derivados, en manchas de sangre.

La hemoglobina, diluida en agua (oxihemoglobina) tiene dos bandas de absorción en la zona del espectro visible cuyos máximos se encuentran a 575 y 540 nm., respectivamente; así como la banda de Soret, típica de los derivados porfirínicos, próxima a la región del ultravioleta, que para la hemoglobina se encuentra a 412 nm., siendo esta banda mucho más ancha que las dos primeras.

En la investigación criminalística, no es suficiente con obtener el espectro de la oxihemoglobina, sino que es necesario someter la muestra a una marcha espectral. Algunos autores (J.A. Gisbert Calabuig) señalan la siguiente:

Se extrae la mancha de sangre con agua destilada, se filtra y se lleva a un espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz, que permita realizar un barrido espectral con registro gráfico, la hemoglobina así estudiada registra bandas de absorción a 575, 540 y 412 nm.

La muestra anterior se alcaliniza con hidróxido de potasio y se le añaden unas gotas de piridina; la solución toma un color verde que corresponde a la hematina alcalina. En el espectro se observará que desaparecen las bandas anteriores y se obtendrá en cambio una banda a 600nm.

Posteriormente y a ese mismo tubo, se añaden unas gotas de un reductor como el sulfhidrato de amonio recientemente preparado, formándose así el hemocromógeno, con el que se registran bandas de absorción con máximos a 559 y 530 nm.

En la práctica forense cotidiana en el laboratorio de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, se ha comprobado que una mancha es de sangre con una metodología espectroscópica mucho más simple y rápida, procediendo como sigue:

1. Impregnar un pequeño trozo de 5x5 mm de tela limpia, sin apresto, de color blanco con la muestra problema.
2. Colocar la muestra así obtenida en un tubo de ensayo y añadirle 5mL de agua destilada, dejándola reposar durante 10 minutos para lograr una eficiente extracción; pasado este tiempo, filtrar.

3. Efectuar el barrido espectral en la zona del espectro visible; se obtendrán tres bandas de absorción: dos finas a 575 y 540 nm y una ancha a 412. Éste espectro corresponde a la oxihemoglobina.

4. Efectuar nuevamente la extracción de la muestra problema como se indica en punto 2, pero utilizando en vez de agua destilada, 5mL de una solución de ferricianuro de potasio al 0.5%. Al realizar el barrido espectral en la región del visible, se obtendrá una banda a 630 nm, banda que corresponderá a la metahemoglobina.

5. Sobre la misma celda de muestra, añadir unos gránulos de cianuro de potasio; al efectuar el registro espectroscópico, deberá desaparecer la banda de la longitud de onda correspondiente a 630 nm y se obtendrá una banda a 540 nm debida a la formación de cianometahemoglobina.

5. Técnica de Luminol

5.1. Fundamento químico

El luminol, químicamente denominado 5-amino-2,3-dihidro-ftalazino-1,4-diona, produce una brillante quimioluminiscencia (producción de luz por reacción química) cuando es oxidado por el agua oxigenada o por el perborato de sodio en presencia de diluciones sanguíneas.

Se considera esta reacción como la más indicada para la localización de manchas invisibles y también para ensayos directos de naturaleza catalítica, que presenta ventajas sobre los anteriormente descritos en mérito a los argumentos que se especifican:

- Es altamente sensible.
- Es comparativamente, aunque no totalmente, específica.
- Permite tratar en forma rápida grandes superficies para la localización de las manchas no visibles al examen ocular directo.
- No interfiere en la ejecución de ensayos similares o de otro tipo.

5.2. Preparación del reactivo

El reactivo se prepara de la siguiente manera, en el momento de utilizarse:

Solución A	Luminol	0.1 g
	Carbonato de sodio	1 g
	Agua destilada c.b.p.	100mL
Solución B	Hidracina hidratada al 95%	0.1g
	Agua destilada	100 partes

A 1 mL de la solución A, se le añade una gota de agua oxigenada e inmediatamente después, dos gotas de la solución B; se espera un minuto y la mezcla se asperjea sobre la zona sospechosa. En caso positivo, las manchas de sangre producen luminiscencia.

Como reactivo, no altera la mancha, se puede continuar con la metodología normal.

III. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

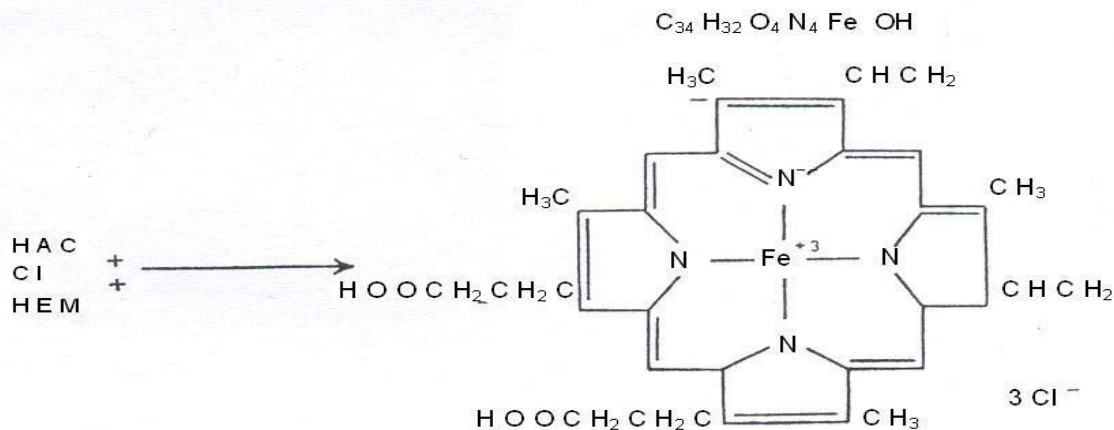
1. Cristales de clorhidrato de hematina o hemina o de Teichman (Ensayo microcristaligráfico)

Consiste en obtener diversos derivados de descomposición de la hemoglobina de formas y color definidos mediante tratamientos adecuados con variados reactivos (ácidos y alcalinos).

1.1. Fundamento Químico

La hemoglobina, cuando es tratada con ácido acético, se separa inmediatamente de las proteínas y del grupo prostético. Durante la hidrólisis la globulina se desnaturaliza.

La oxidación del hierro del grupo hem se efectúa más rápidamente en medio ácido que en medio alcalino. Si está presente un halógeno inorgánico como el cloro, se formarán cristales insolubles de cloruro de ferriprotoporfirina o hemina:



Cloruro de ferriprotoporfirina (hemina)

1.2. Preparación del Reactivo:

Cloruro de sodio	0.1g
Bromuro de potasio	0.1g
Ioduro de potasio	0.1g
Ácido acético c.b.p.	100mL

1.3. Procedimiento:

1. Colocar la muestra problema en el centro de una laminilla de vidrio y poner encima de ella un cubreobjetos.
2. Deslizar entre lámina y laminilla, por capilaridad, unas gotas del reactivo de Teichmann.
3. Calentar lentamente y a baja temperatura la laminilla hasta evaporación.
4. Dejar enfriar y observar al microscopio.

En caso positivo se observarán cristales romboidales de color café oscuro.

Esta forma cristalina aparece más bien en la periferia de la preparación donde los cristales suelen concentrarse.

2. Prueba de Takayama (Hemocromógeno)

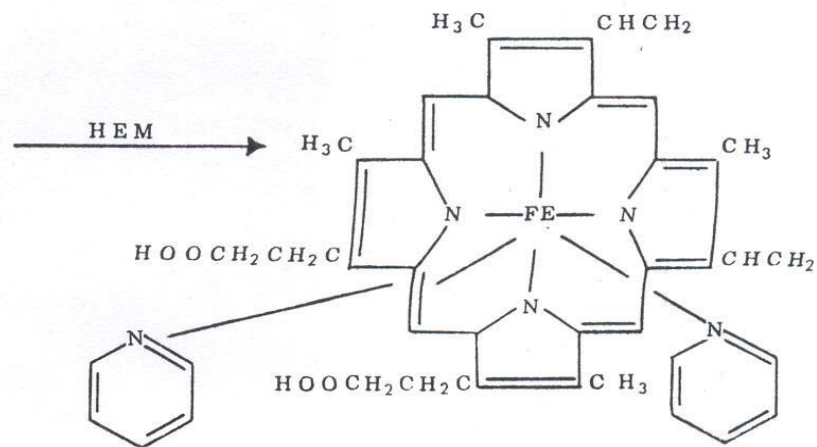
Tanto la ferroprotoporfirina como la ferritoporfirina tienen la propiedad de combinarse con otros compuestos nitrogenados por medio de la globulina.

Tales compuestos incluyen otras proteínas, hidróxido de amonio, cianuro, nicotina y piridina y los productos resultantes se llaman hemocromógenos. Los cristales pueden formarse tanto en medio ácido como alcalino; sin embargo, el reactivo de Takayama es de naturaleza alcalina.

2.2. Mecanismo de la Reacción

El hidróxido de sodio efectúa una hidrólisis alcalina, liberando el grupo prostético de la globina; el hierro del hem en este momento se encuentra como ión férrico (+3) debido a la formación de la metahemoglobina en el proceso de desecación de la mancha de sangre. La carga (+3) del hierro se neutraliza por el ión OH. Calentando la glucosa (a azúcar reducida), se reduce el ión férrico a ferroso (+2) y la piridina se combina con éste para formar un producto cristalino insoluble: el hemocromógeno o piridinferroprotoporfirina.

NaOH + Glucosa + Piridina



Piridinferroprotoporfirina
Hemocromógeno

La prueba es más sensible y sencilla que la de los cristales de hemina y no se dan casos de falsas reacciones positivas.

2.3. Preparación del Reactivo de Tacayama

Mezclar:

Una parte de solución saturada de glucosa.

Una parte de solución de hidróxido de sodio al 10%.

Una parte de piridina (PM: 79.1 D == 048).

Dos partes de agua destilada.

Una vez preparada la muestra se guarda en frasco ámbar. La solución deberá ser preparada inmediatamente antes de utilizarse.

2.4. Procedimiento:

- a) Colocar una pequeña cantidad de muestra problema entre una laminilla portaobjetos y un cubreobjetos.
- b) Deslizar por capilaridad unas gotas del reactivo entre lámina y laminilla.
- c) Calentar la laminilla a baja temperatura durante 30 segundos.
- d) observar al microscopio. En caso positivo se observarán cristales romboidales de color rosa alrededor de la muestra.

IV. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN SANGRE FRESCA CON FINES FORENSES

1. Recolección y preparación de las muestras sujetas a estudio

1.1. En personas vivas:

- a) Tomar 5mL de sangre venenosa con una aguja estéril y seca.
- b) Separar el suero por centrifugación.
- c) Hacer una suspensión del paquete globular al 2% en el propio suero de la muestra tomada, para efectuar determinaciones en tubo de ensayo y al 5% para determinaciones en placa.

1.2. En cadáveres

- a) Tomar 5mL de sangre de una arteria o vaso grueso o bien de la cavidad cardiaca teniendo cuidado de que no se contamine con tejido adiposo del propio cadáver.
- b) Separar el paquete globular por centrifugación.
- c) Lavar el paquete globular tres veces con solución salina fría, fresca y estéril (por lavar glóbulos rojos se entiende: depositar una pequeña cantidad de glóbulos rojos en el fondo del tubo; llenarlo con solución salina; mezclar invirtiendo el tubo suavemente varias veces, desechar y desechar el sobrenadante).
- d) Hacer una suspensión de esos glóbulos al 2% en solución salina para determinaciones en tubo al 5% para determinaciones en placa.

1.3. En coágulos

- a) Exprimir cuidadosamente el coágulo contra las paredes de un tubo de ensayo de 13x100, con el auxilio de un aplicador de madera.
- b) Lavar lo extraído durante tres ocasiones con solución salina.
- c) Con los glóbulos lavados, hacer suspensiones al 2% y al 5% igual que el de los casos precedentes.

1.4. Material empleado

- Centrifuga calibrada a 3400 RPM
- Tubos de ensayo de 12x75 mm
- Laminillas portaobjetos o placas hemoclasificadoras
- Pipetas pasteur (con punta uniforme)
- Bulbos de goma
- Aplicadores de madera
- Solución salina fresca y estéril (8.5g de cloruro de sodio disueltos en 1000mL de agua destilada)
- Suero humano hemoclasificador: Anti-A, Anti-B, Anti-AB y Anti Rh⁰D

2. Determinación del Grupo en Tubo

- a) Preparar suspensiones de glóbulos rojos al 2% en solución salina.
- b) Colocar una gota de suero Anti-A en tubo de ensayo marcado como A.
 - Una gota de suero Anti-B en un segundo tubo asignado como B.
 - Una gota de suero Anti-AB en un tercer tubo asignado como C.
 - Una gota de suero Anti-Rh⁰D en un cuarto tubo al que se le anotará Rh.
- c) Añadir a cada tubo una gota de suspensión de eritrocitos preparada en “a”.
- d) Mezclar y centrifugar 15 segundos a 3400 RPM para los primeros tres tubos y 90 segundos para el correspondiente al Rh.
- e) Agitar suavemente para desprender al botón globular y observar la presencia o ausencia de aglutinación.

Interpretación de Resultados

- a) Si se observa la aglutinación en el tubo A; la sangre corresponderá al grupo A.
- b) Si se observa la aglutinación en el tubo B; la sangre corresponderá al grupo B.
- c) Si se observa la aglutinación en los tubos A, B, y AB; la sangre corresponderá al grupo AB.
- d) Si no se observa aglutinación ni en A ni en B ni en AB; el grupo será O.
- e) Si se observa aglutinación en el tubo 4, la sangre será Rh positivo; si no lo hay, la muestra será Rh negativo.

3. Determinación del Grupo en placa

- a) Preparar suspensiones de eritrocitos al 5% en solución salina.
- b) Dibujar sobre la parte superior de la placa las siguientes anotaciones: A, B, AB y Rh.
- c) Colocar una gota de Anti-A, Anti-B, Anti-AB y Anti-Rh⁰D en el mismo orden indicado para hacer las anotaciones.
- d) Añadir sin mezclar y a un lado de las gotas de antisueros, una gota de suspensión de eritrocitos al 5%.
- e) Mezclar la suspensión de eritrocitos con la ayuda de un aplicador de madera, con cada uno de los antisueros previamente colocados.
- f) Observar microscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación a los 30 segundos.
- g) La interpretación será igual que en caso anterior.

El mayor grado de confiabilidad se obtendrá si se realiza la prueba en tubo, pero será preferible emplear las dos técnicas.

4. Determinación del Grupo Sanguíneo en Manchas de Sangre Fresca

En muestras de sangre fresca, el problema es más simple ya que reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son factibles, sin embargo los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente por la sequedad y en este sistema sobreviven durante algún tiempo y conservan la capacidad de combinarse con anti-cuerpos específicos. La formación de estos complejos antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas en manchas de sangre seca.

Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un buen soporte, como son fibras textiles, las partículas allí adheridas conservan eficientemente el material antigénico. La técnica de absorción-elución tiene como fundamento un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo homólogo, después de que la absorción es completa, el excedente de anticuerpo se elimina por medio de lavados con solución salina fría. El complejo antígeno anticuerpo se disocia por calentamiento, generalmente a 56° C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con eritrocitos lavados de propiedades antigénicas conocidas, finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido.

La técnica de absorción elusión es actualmente la más satisfactoria para la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca y también se reporta que puede usarse para el sistema MN, de que sus antígenos son más difícilmente detectables por la especificidad y mala calidad de los antisueros disponibles y en el caso del sistema Rh⁰D, otros grupos del sistema y sus cinco subgrupos.

La técnica de absorción inhibición debe ser empleada de todas maneras paralelamente a la anterior para la determinación del grupo en manchas de sangre, y por otra parte cabe señalar que es el procedimiento de elección en las determinaciones de grupo de saliva y líquido seminal, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble.

V. TÉCNICA DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE

Uno de los problemas que con frecuencia se presentan en los laboratorios de criminalística, es el de determinar el grupo sanguíneo en sangre seca que se encuentra impregnando prendas de vestir o sobre la superficie de objetos relacionados con algún hecho de sangre.

Revisadas las técnicas que para este efecto existen hasta la fecha, se pensó que la más fácil de realizar y la más conveniente desde el punto de vista inmunológico es la de absorción elusión.

MATERIAL EMPLEADO

1. Sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B, anti-AB y anti-D.
2. Metanol
3. Na_2HPO_4
4. KH_2PO_4
5. NaCl
6. Tubos de ensayo de 13x10
7. Pipetas Pasteur
8. Bulbos de goma
9. Tijeras
10. Aplicadores de madera
11. Guantes desechables
12. Tela estéril y sin apresto, de algodón
13. Gradillas para tubos de ensayo de 13x100
14. Refrigerador
15. Centrífuga
16. Baño María a temperatura constante
17. Tijeras

REACTIVOS

1.- Buffer salino (solución Standard)

a) Solución 1/15 M de Na_2HPO_4 (9.47 gr/L)

b) Solución 1/15 M de KH_2PO_4 (9.08 g/L)

2.- Buffer final

A 72 mL. de la solución a), añadir 50 mL. de la solución b) y 8.5gr. de cloruro de sodio Q.P. Aforar a 1,000mL. en matraz volumétrico (pH = 7.2)

3.- Preparación de los antisueros:

Los sueros anti-A y anti-B, se diluyen de la siguiente manera: a 1.0 mL. de antisuero, se añaden 10 mL. de solución de buffer final.

Los sueros anti-AB y anti-D, se utilizan sin diluir.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Cortar cuatro fragmentos de tela impregnada con sangre problema, que medirán 3mm cuadrados (cuando la mancha problema no se encuentre sobre la tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela de algodón de color blanco, sin apresto y esterilizada, que en caso necesario puede secarse en la estufa) y colocar cada recorte en los tubos necesarios.
- 2.- Los tubos se colocan en una misma columna de una gradilla (como se ilustra en 4.5), columna que se marcará como *Problema*.
- 3.- En la forma antes descrita se prepara otra serie de tubos en cuyo interior se colocarán fragmentos de tela manchados con sangre de grupo conocido: A, B, AB y O, marcándose tal columna *Testigo*.
- 4.- Igualmente se colocará otra serie de tubos que contengan fragmentos de una parte de tela en estudio, que no se encuentre maculada con sangre y se pondrán y se pondrán en una tercera columna signada como *Control*.
- 5.- Obsérvese en el diagrama siguiente como las hileras horizontales de la gradilla se marcarán anti-A, anti-B y anti-D; en cada una de ellas y en la columna correspondiente al *Testigo*, se encontrará al respectivo tubo conteniendo muestras de grupo conocido, requisito sin el cual la técnica carece de validez.
- 6.- Fijar las manchas de sangre impregnadas en la tela, cubriéndolas con metanol cuando menos durante 15 minutos. Después de ese tiempo eliminarlo totalmente.
- 7.- Agregar a cada tubo de la hilera anti-A, dos gotas de suero anti-A; a los de la hilera B, suero anti-B; a los de la hilera AB, suero anti AB y a los de la hilera anti-D, suero anti-D.
- 8.- Dejar en refrigeración durante toda la noche a 4°C.
- 9.- Lavar con solución salina fría 6 veces o hasta obtener una solución clara e incolora.
- 10.- Añadir a cada tubo dos gotas de solución salina a temperatura ambiente.
- 11.- Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C durante 10 ó 15 minutos.
- 12.- Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferente para cada tubo.

13.- Agregar una gota de glóbulos lavados al 2%:

Del grupo A a los tubos de la hilera A

Del grupo B a los tubos de la hilera B

Del grupo AB a los tubos de la hilera AB

Del grupo D a los tubos de la hilera D

(problemas, control, testigo)

14.- Configurar durante treinta segundos a 3,400 revoluciones por minuto.

15.- Observa si existe, o no, aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1.- Si hay aglutinación en el tubo problema de la hilera marcada como anti-A, el grupo corresponderá al A; puede aglutinar ligeramente en el tubo problema de anti-AB.

2.- Si hay aglutinación en el tubo problema de la hilera marcada como anti-B, el grupo corresponderá al B; también puede aglutinar ligeramente en el tubo problema de anti-AB.

3.- Si hay aglutinación en los tubos problemas marcados: anti-A, anti-B y anti-AB, el grupo de la muestra analizada corresponderá al AB.

4.- Si existe aglutinación en el tubo problema de la hilera anti-D el factor Rh será positivo, si no existe aglutinación al factor Rh será negativo.

5.- Si no hay aglutinación en los tubos problema de las tres primeras hileras, el grupo sanguíneo corresponderá al O.

CONCLUSIONES

Este trabajo pretende ser una revisión de las principales técnicas empleadas en hematología forense, el cual permitirá su mejor utilización como referencia rápida para el trabajo rutinario del área de hematología en el laboratorio de química forense.

Con la información obtenida, se realizó un Manual, con la finalidad de apoyar al profesional en el laboratorio de hematología forense y que pueda consultar las bases principales sobre como se debe de preservar el lugar de los hechos, recolectar la muestra y su envío para posteriores estudios en el laboratorio, así como la metodología e interpretación de los resultados después de realizar las diferentes técnicas serológicas para la identificación de sangre.

Todo esto sin dejar de lado la calidad con la que se va a trabajar en cada caso y la acción que debe de seguir el profesional ante cada investigación para la aclaración de un hecho delictuoso y que no quede en tela de juicio los resultados obtenidos.

Con este manual se da a conocer la importancia de las técnicas que se realizan en el área de Química Forense y Hematología Forense para dar un resultado satisfactorio al Ministerio Público y poder ayudar al esclarecimiento de un hecho delictuoso, teniendo los fundamentos de cada una de las técnicas realizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rostand, Jean, Introducción a la Historia de la Biología. Edit. Artemiasa, S.A. de C.V., México, 1986.
2. Balthazard, V., Manual de Medicina Legal. Editorial Salvat. 6ª. Edición. Barcelona, 1945.
3. Kina, S.S. Methods in Forensic Science. Vol. 3. Interscience Publisher, New Cork, 1964.
4. Gradwohl's Legal Medicine. Ed. Francis E. Camps. Baltimore, 1968.
5. Franco de Ambriz Martha, Hematología Forense. Editorial Porrúa. 4ª. Edición. México, 2002.
6. The Examination of Serological Evidence in the FBI Laboratory-Forensic Science Research and Training Center. FBI Academy Quantico, Virginia 22135, 1989.
7. Durán Arias Jaime, Criminalística y Utilización Científica de la prueba Material en la Práctica Forense, Pontificia Universidad Católica de Ecuador, 1ª. Edición, Quito, 1977.
8. Helmut Hoetzsche, Técnicas Modernas de Investigación Policial, Instituto Nacional de Ciencias Penales, 1ª. Edición, México, 1992.
9. Raúl Enrique Zajaczkowsky, Manual de Criminalística, Ediciones Ciudad Argentina, Buenos Aires, 1998.
10. Juventino Montiel, Manual de Criminalística I, Grupo Noriega Editores, México, 1992.
11. Gaspar Gaspar, Nociones de Criminalística e Investigación Criminal, Editorial Universidad, Buenos Aires, 2000.
11. Albarracin Roberto, Manual de Criminalística, Editorial Policial, 1ª. Edición, Buenos Aires, 1969.
12. Bernard Knight, Medicina Forense de Simpson, Edit. El Manual Moderno, México, 1994.
13. Shirlyn B Mckenzie, Hematología Clínica, Edit. El Manual Moderno, 2ª. Edición, México, 2000.
14. Guillermo J Ruiz Argüelles, Fundamentos de Hematología, Editorial Médica Panamericana, México, 1994.
15. Roberts S Hillman, Manual de Hematología, Edit. El Manual Moderno, México, 1998.