

Avaliação comparativa de teste imunocromatográfico para identificação forense de sangue humano

P. Longo ^a; C.R. Dias Filho ^b; M.P.O. Valadares ^c; E.C. Alonso ^d; S.P.S. Gonçalves ^e; E. Auler-Bittencourt ^{e,*}

^a Perito Criminal – Núcleo de Perícias Criminalísticas de Araraquara (Instituto de Criminalística de São Paulo), Brasil

^b Perito Criminal – Equipe de Perícias Criminalísticas de Americana (Instituto de Criminalística de São Paulo, Brasil)

^c Perito Criminal – Núcleo de Perícias em Crimes Contra a Pessoa (Instituto de Criminalística de São Paulo), Brasil

^d Graduando em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências (Universidade de São Paulo), Brasil

^e Perito Criminal – Núcleo de Biologia e Bioquímica (Instituto de Criminalística de São Paulo), Brasil

Endereço de e-mail para correspondência: eloisa.eaab@policiacientifica.sp.gov.br

Recebido em 20/04/2011; Revisado em 23/08/2011; Aceito em 08/09/2011

RESUMO

A determinação de especificidade humana pode indicar a presença de sangue humano, mesmo em amostras antigas providas de investigações criminais, contaminadas ou em estado de putrefação. O presente estudo visa analisar se há concordância entre os resultados obtidos pelos testes de orientação e específico para sangue humano utilizados rotineiramente na análise forense em comparação com o teste imunocromatográfico para detecção da hemoglobina humana. O resultado alcançado por meio do anticorpo anti-hemoglobina humana mostrou-se eficiente na detecção qualitativa de hemoglobina humana em amostras de sangue depositadas em peças e locais de crime.

Palavras-chave: identificação de sangue; teste imunocromatográfico; amostras biológicas; identificações criminais; biologia forense.

ABSTRACT

The determination of human specificity may indicate the presence of human blood, even in ancient samples originated from criminal investigations, contaminated or in a state of putrefaction. This study aims to examine whether there is consistency between the results obtained by guidance and specific human blood tests used routinely in forensic analysis in comparison with the immuno-chromatographic test for human hemoglobin detection. The diagnosis using antibody anti-human hemoglobin has been shown to be effective in the qualitative detection of human hemoglobin in blood stains in crime related objects and at crime scenes.

Keywords: blood identification; immuno-chromatographic test; biological samples; criminal investigations; forensic biology.

1. INTRODUÇÃO

A identificação de sangue e de sua origem humana em amostras providas de investigações criminais no Estado de São Paulo tem sido realizada nos laboratórios do Núcleo de Biologia e Bioquímica (NBB) do Instituto de Criminalística (IC) através dos métodos baseados no reagente Kastle-Meyer (para ensaios presuntivos) e no teste indireto de Coombs (para determinação de especificidade humana).

Alguns laboratórios policiais da Alemanha e da Suíça utilizam o teste imunocromatográfico para identificação de sangue humano. Esses testes se utilizam de anticorpo anti-hemoglobina humana que aplicados em amostras de material biológico obtidas em investigação criminal podem indicar a presença de sangue humano, mesmo em amostras antigas, contaminadas ou em estado de putrefação [1]. Assim, esses testes têm se mostrado eficazes e robustos, com grande aplicação à perícia criminal.

Baseado no diagnóstico por meio do anticorpo anti-hemoglobina humana, o Feca-Cult One Step Teste [2] é um teste imunocromatográfico em forma de tira ou dispositivo (Fig.(1)), originalmente desenvolvido para a detecção de hemoglobina humana em fezes. A interpretação do resultado é rápida, por meio da presença de cor em regiões específicas da tira. Sua utilização forense foi posteriormente adaptada por Hochmeister *et al.* [1].

O presente estudo visa analisar se há concordância entre os resultados obtidos pelos testes Kastle-Meyer, Coombs e o Feca-Cult para constatação da presença de sangue humano em peças criminais. Busca também comparar a sensibilidade da determinação de sangue humano em amostras diluídas empregando-se os testes Coombs e Feca-Cult; e avaliar se há influência da oxidação de materiais que constituem as peças de exames sobre o resultado destes testes.



Figura 1. À esquerda, formas de apresentação do Kit Feca-Cult, tira (superior) ou dispositivo (inferior). À direita, tubo coletor contendo suspensão de proteína e conservantes.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material

Os testes foram realizados com o kit Feca-Cult One Step Teste, na forma de tira, produzido por Alamar Tecno Científica Ltda. O kit fornecido (Fig.(1)) contém tiras de teste com reagentes imobilizados em uma membrana em uma proteína matriz com azida sódica e tubos coletores contendo uma suspensão de proteína e conservantes [2].

2.2. Princípio do teste imunocromatográfico

A tira do teste contém uma membrana pré-impregnada com anticorpo monoclonal anti-hemoglobina humana, na área da linha teste, e anticorpo de cabra anti-camundongo, na área da linha controle. Uma almofada com anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana-conjugado de ouro coloidal é colocado no final da membrana, na área de aplicação da amostra. Quando a hemoglobina humana estiver presente na amostra dissolvida na suspensão de proteínas e conservantes, a mistura do conjugado ouro coloidal e a amostra extraída movem-se ao longo da membrana cromatograficamente por ação de capilaridade. Esta mistura, então, migra para a área da linha teste e forma uma linha visível com o complexo de anticorpos com a hemoglobina humana. Na ausência da hemoglobina humana na amostra extraída, não há formação de nenhuma faixa de cor visível na área da linha teste. Portanto, a presença de uma faixa de cor na área da linha teste indica um resultado positivo (Fig. (2)). Uma faixa colorida deverá sempre aparecer na área da linha controle para validação do teste [2], [3].

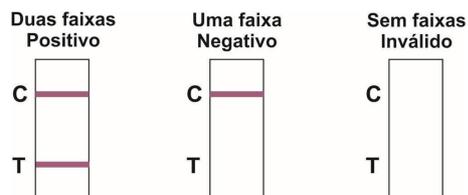


Figura 2. Interpretação do teste. A presença da linha controle (C) indica a validade do teste; a reação colorimétrica na linha teste (T) revela resultado positivo para sangue humano.

2.3. Procedimento de coleta de amostras

As amostras para teste com o Feca-Cult foram obtidas utilizando-se três procedimentos, denominados A, B e C, de acordo com os parâmetros estabelecidos, concentração e quantidade da amostra. O procedimento “A” foi utilizado com amostras mais concentradas e em maior quantidade e consistiu em esfregar a parte estriada da haste do aplicador (Fig.(3)) sobre a mancha (Fig.(4)) e introduzir no tubo coletor, agitando o tubo vigorosamente, de maneira a assegurar uma boa difusão e homogeneização da solução. Os procedimentos “B” e “C” foram utilizados com amostras menos concentradas e em menor quantidade. “B” consistiu em recortar um fragmento da amostra e introduzir no orifício do tubo coletor para a extração do material com a solução (Fig. (5)). Em “C”, um pedaço da amostra é colocado em um tubo de ensaio junto com o conteúdo de solução de 1 tubo coletor (Fig.(6)). O tubo é agitado e deixa-se extraindo por alguns segundos.

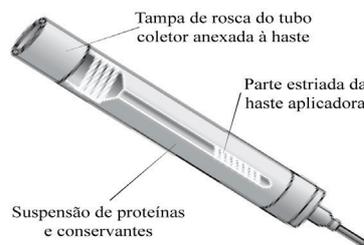


Figura 3. Ilustração do tubo coletor do Feca-Cult, contendo uma haste aplicadora imersa em suspensão de proteínas e conservantes [2].

Após a extração das amostras em “A” e “B”, a extremidade do tubo coletor foi rompida e foram dispensadas 3 gotas na extremidade absorvente da tira (Fig.(7)). No procedimento “C”, a solução da amostra extraída no tubo de ensaio foi gotejada 3 vezes sobre a extremidade absorvente da tira com o auxílio de uma pipeta. O resultado foi lido em 5 minutos.

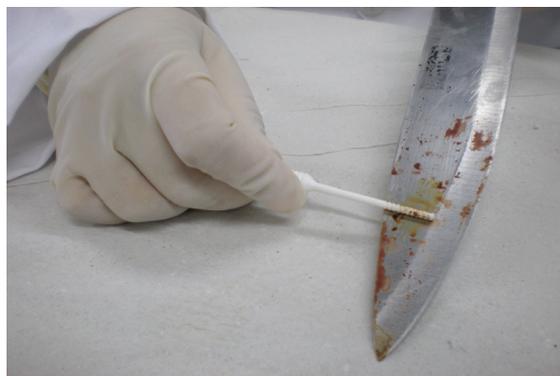


Figura 4. Procedimento “A”: esfrega-se a parte estriada da haste do aplicador sobre a mancha



Figura 5. Procedimento "B": introduz-se um fragmento da amostra pelo orifício do tubo coletor



Figura 6. Procedimento "C": um pedaço da amostra é colocado em um tubo de ensaio junto com o conteúdo de solução de 1 tubo coletor.

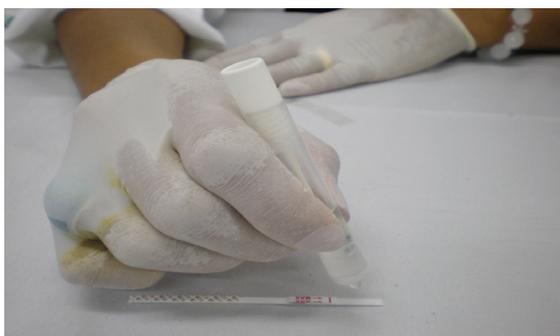


Figura 7. Após macerada a amostra nos procedimentos, dispensam-se 3 gotas na extremidade absorvente da tira.

2.4. Testes de identificação de sangue e de especificidade humana

A hemoglobina é uma proteína conjugada que está presente nos glóbulos vermelhos do sangue e tem papel fundamental nesses testes. É constituída pela proteína globina e pelo grupo heme [3].

O reagente de Kastle-Meyer funciona como indicador após a adição de peróxido de hidrogênio à amostra em solução fisiológica. O teste é baseado na atividade catalítica do heme da hemoglobina que atua sobre o peróxido e libera oxigênio que oxida o indicador do reagente, fenolftaleína, dando coloração rosa à solução. O teste pode fornecer resultados falso-positivos com outras substâncias, mas reações negativas são prova da ausência ou de quantidades não detectáveis de heme [3]. Os trabalhos consultados apresentaram diferentes sensibilidades para o reagente: 1:1.000 e 1:1.000.000 [3], [4]. No presente trabalho, apenas as amostras positivas

com o teste de Kastle-Meyer, foram também analisadas pelo teste de Coombs [3].

O teste sorológico de Coombs ou Teste da Antiglobulina Humana identifica a presença de uma proteína presente no soro do sangue humano na superfície dos glóbulos vermelhos, a globulina. Esse teste detecta anticorpos incompletos de grupos sanguíneos no soro (teste indireto da antiglobulina). Anticorpos incompletos são aqueles que falham em aglutinar glóbulos vermelhos suspensos em salina. Na reação da antiglobulina, glóbulos vermelhos envolvidos com anticorpos incompletos, como anti-Rh IgG, são aglutinados por anti-IgG, o qual liga as moléculas de IgG através de pontes aos glóbulos vermelhos vizinhos. O fundamento do método é que a globulina humana inibe a atividade do soro antiglobulina humano, o qual perde a capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos sensibilizados por anticorpos incompletos. Se uma mancha de sangue contém globulinas do soro humano e é incubada com anti-soro globulina humano, essas globulinas neutralizam o anti-soro e quando são adicionadas células 'O' Rho(D) (fornecidas no kit do teste sorológico de Coombs) sensibilizadas com anticorpos incompletos, nenhuma aglutinação ocorre, sendo a mancha de sangue, portanto, de origem humana. A formação de aglutinação significa que a mancha de sangue não contém globulina humana e que o anti-soro globulina humano ficou livre para formar pontes, aglutinando os glóbulos vermelhos sensibilizados. A sensibilidade do teste é da ordem de 1:50.000 [3].

2.5 Avaliação da sensibilidade dos testes para detecção de sangue humano

2.5.1 Coleta do material para determinação de sensibilidade dos testes

Foram coletados 5 mL de sangue humano por punção venosa para serem empregados nas diluições, com especial atenção para a medição dos volumes empregados nos procedimentos antes da coagulação

2.5.2 Diluentes empregados

As seqüências de diluição foram efetuadas distintamente com água destilada, solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e solução salina tamponada do tubo coletor do Feca-Cult.

2.5.3 Método empregado

Foi transferido 1 mL de sangue humano in natura para cada um dos três recipientes contendo os diluentes especificados à temperatura ambiente, a partir dos quais foram efetuadas as diluições de 1:1.000, 1:2.000, 1:3.000, 1:4.000, 1:5.000, 1:6.000, 1:7.000, 1:14.000, 1:28.000, 1:56.000, 1:112.000, 1:224.000, 1:448.000, 1:500.000, 1:896.000 e 1:1.000.000. O teste de Coombs foi aplicado para as diluições de 1:1.000 a 1:7.000, enquanto o Feca-

Cult foi aplicado em todas as diluições.

2.6 Avaliação da influência de oxidação de peças sobre o resultado dos testes de Coombs e Feca-Cult

Foram analisadas lâminas de aço oxidadas e não oxidadas encaminhadas ao Núcleo de Perícias Criminalísticas (NPC) de Araraquara para pesquisa de sangue humano, comparando-se os resultados dos testes de Coombs e Feca-Cult.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Procedimento de coleta de amostras

Um total de 130 amostras foram analisadas através dos procedimentos A, B e C. O procedimento "A" mostrou-se prático, porém bastante limitado. Pôde ser usado quando houve manchas hematóides concentradas em objetos rígidos, tais como faca, de modo que a substância hemática se aderiu facilmente às estrias da haste do tubo coletor. Foi utilizado em 12 amostras (9,23%) dos testes. Já o procedimento "B" se mostrou pouco prático, devido ao orifício do tubo coletor possuir diâmetro de cerca de 2 mm, o que dificulta a inserção de um fragmento de amostra maior; sendo utilizado em apenas 15 amostras (11,54%) dos testes. O procedimento "C" apresentou-se relativamente prático e serviu para qualquer concentração de amostra. Foi o mais utilizado, sendo empregado em 103 amostras (79,23%).

3.2. Comparação entre os testes de Kastle-Meyer, de Coombs e Feca-Cult

A Tabela (1) expressa os resultados dos testes de Coombs e Feca-Cult. Os resultados para Coombs/Feca-Cult +/+, NR/- e -/-, que equivalem a 95,4% dos resultados, indicaram concordância entre os testes.

Tabela 1. Resultado dos testes de Kastle-Meyer, de Coombs e Feca-Cult das amostras analisadas (n=130).

Kastle-Meyer	Coombs	Feca-Cult	Nº de amostra
+	+	+	86 (66,2%)
-	NR	-	30 (32,1%)
+	-	-	8 (6,2%)
+	-	+	5 (3,8%)
-	- *	+	1 (0,8%)

(+) positivo; (-) negativo; (NR) não realizado

* realizado na tentativa de se esclarecer o resultado divergente.

Apenas 6 (4,6%) amostras indicaram divergência entre Coombs e o Feca-Cult. Testes imunocromatográficos para especificidade humana, como o Feca-Cult, apresentam resultado positivo para sangue total diluído até 1:1.000.000. No teste de Coombs, resultados positivos são obtidos com sangue total diluído até 1:50.000 [3]. Logo, o Feca-Cult é vinte vezes mais sensível que o teste de Coombs na identificação de sangue humano. Todas

as amostras que tiveram resultados divergentes entre o Feca-Cult e o Coombs foram obtidas de peças com substância hematóide em baixa quantidade, o que pode ter sido detectado pelos testes de Kastle-Meyer e Feca-Cult, mas não pelo teste de Coombs, devido a sua menor sensibilidade.

O resultado negativo para o método de Kastle-Meyer foi obtido em apenas uma amostra de uma faca que particularmente se encontrava em estado avançado de oxidação. O resultado positivo para o Feca-Cult indicou presença de hemoglobina humana [2]. No entanto, o método de Kastle-Meyer, que resulta positivo quando da presença de hemoglobina [4], não constatou a presença de sangue. Essa divergência pode ser explicada pela sensibilidade variável do reagente de Kastle-Meyer. Diferentes sensibilidades para o método foram citadas por diferentes autores, diferindo em até mil vezes [3], [4]. Assim, o reagente de Kastle-Meyer pode ter sensibilidade inferior àquela atribuída ao Feca-Cult. Outra possibilidade seria de que o elevado grau de oxidação da peça pode ter suprimido a capacidade da hemoglobina de reduzir o peróxido de hidrogênio no método de Kastle-Meyer. O teste de Coombs foi excepcionalmente realizado nessa amostra negativa para sangue genérico, mas resultou negativo, o que era esperado devido sua menor sensibilidade quando comparado ao Kastle-Meyer.

3.3. Comparação da sensibilidade dos testes de detecção de sangue humano

Os resultados obtidos, conforme cada concentração e os diluentes empregados encontram-se nas Tab.(2) e (3).

Os resultados expostos na Tab.(2), ilustrados da Fig.(8), apontaram a detecção de sangue humano nas soluções de concentração até 1/4.000 empregando-se o teste de Coombs, tendo-se como solvente a solução fisiológica e a solução salina tamponada. Para as concentrações de sangue de 1/5.000 a 1/7.000, os resultados foram negativos, observando-se no microscópio óptico as aglutinações características destes resultados negativos.

Para as amostras diluídas em água destilada, todos os tubos apresentaram aglutinações, caracterizando os resultados negativos para o método sorológico empregado. Assim, para as concentrações diluídas de sangue humano, a hemólise das hemácias, ocasionada pela água destilada, impossibilitou sua aglutinação, gerando resultados falso-negativos em concentrações que deveriam ser detectadas pelo método sorológico. Portanto, para que haja a preservação do sangue, a coleta das amostras em locais de crime deve ser efetuada com solução fisiológica ou salina tamponada.

O teste Feca-Cult apontou resultados positivos nas concentrações de 1/5.000 a 1/7.000, não detectadas pelo método sorológico, evidenciando sua maior sensibilidade (Fig.(8)).

Tabela 2. Resultados da detecção de sangue humano empregando-se como diluente água destilada, solução fisiológica e salina tamponada, comparando-se os testes de Coombs e Feca-Cult.

Concentração	Água destilada		Solução Fisiológica		Salina Tamponada	
	Coombs	Feca- Cult	Coombs	Feca- Cult	Coombs	Feca- Cult
1/1000	-	+	+	+	+	+
1/2000	-	+	+	+	+	+
1/3000	-	+	+	+	+	+
1/4000	-	+	+	+	+	+
1/5000	-	+	-	+	-	+
1/6000	-	+	-	+	-	+
1/7000	-	+	-	+	-	+

(+) positivo; (-) negativo.



Figura 8. Ilustração dos resultados positivos apontados na Tab.(2) obtidos pelo método de membrana reativa Feca-Cult. Da esquerda para a direita, os resultados referem-se às concentrações de 1/1.000 a 1/7.000.

Na Tabela (3), foram apontados os resultados provenientes do método Feca-Cult para concentrações acima de 7.000 vezes de diluição. Os resultados obtidos apontaram para a detecção de sangue humano em concentrações extremamente reduzidas quando comparados aos resultados obtidos pelo método sorológico atualmente empregado pelos Núcleos de Perícias Criminalísticas.

Tabela 3. Resultados da detecção de sangue humano em diferentes diluentes e concentrações: água destilada, solução fisiológica e salina tamponada, empregando-se o Feca-Cult.

Concent.	Feca- Cult		
	Água destilada	Solução fisiológica	Salina tamponada
1/14.000	+	+	+
1/28.000	+	+	+
1/56.000	+	+	+
1/112.000	+	+	+
1/224.000	+	+	+
1/448.000	+	+	+
1/500.000	+	+	+
1/896.000	+	-	-
1/1.000.000	+	-	-

(+) positivo; (-) negativo.

As amostras que continham o sangue humano diluído em solução fisiológica revelaram resultados positivos até a concentração de 1/500.000. Estes

resultados também foram observados nas amostras diluídas com solução salina tamponada fornecida com o kit. Ressalta-se que a faixa positiva da membrana revelou-se mais intensa na diluição empregando-se a salina em comparação à solução fisiológica (Fig.(9)).

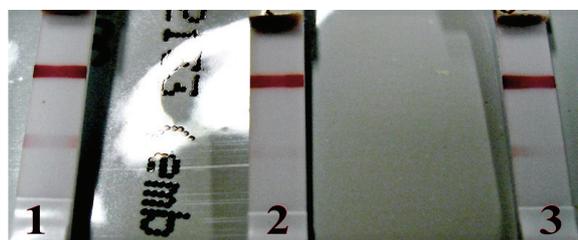


Figura 9. Membranas reativas Feca-Cult resultantes da análise de soluções de sangue humano com concentração de 1/500.000, diluídas em água destilada (1), solução fisiológica (2) e solução salina tamponada (3).

Os melhores resultados foram obtidos nas leituras das membranas reativas efetuadas com as amostras diluídas em água destilada, onde se obteve resultado positivo para sangue humano na concentração de 1/1.000.000.

A lise das hemácias pela água destilada pode ter auxiliado na detecção de sangue humano em concentrações abaixo de 1:500.000, disponibilizando mais hemoglobina na solução devido à ruptura dos eritrócitos, quando comparada com as soluções contendo hemoglobinas íntegras das diluições efetuadas com as outras duas soluções testadas.

Conforme Fig.(10), nota-se que a intensidade das colorações da fita teste é muito semelhante para todos os solventes utilizados na diluição, ainda que a concentração da solução com água destilada seja a metade (1/1.000.000) das demais (1:500.000).

3.4 Avaliação da influência de oxidação de peças sobre o resultado dos testes de Coombs e Feca-Cult

Os resultados dos testes de Coombs e Feca-Cult da análise de influência de oxidação sobre o resultado destes testes estão expressos na Tab.(4).

Tabela 4. Resultados da detecção de sangue humano em amostras oxidadas e não oxidadas

Peça	Coombs	Feca-Cult
Lâmina de aço oxidada 1	+	+
Lâmina de aço oxidada 2	+	+
Lâmina de aço oxidada 3	-	+
Lâmina de aço oxidada 4	+	+
Lâmina de aço oxidada 5	-	-
Lâmina de aço não oxidada 1	+	+
Lâmina de aço não oxidada 2	+	+
Lâmina de aço não oxidada 3	-	-
Lâmina de aço não oxidada 4	-	-

(+) positivo; (-) negativo.

Observa-se concordância de 88,9% (n=9) entre os testes de Coombs e Feca-Cult. A exceção se dá na lâmina oxidada 3, cujo resultado do Feca-Cult se revelou em três minutos, mesmo tempo de revelação das amostras de sangue humano diluído entre 1:500.000 e 1:1.000.000. Isso pode explicar o resultado negativo do teste de Coombs para esta lâmina, considerando a diferença de sensibilidade deste método quando comparado com o Feca-Cult: é provável que a concentração de sangue fosse inferior à detectável por Coombs, mas acima do limite de detecção pelo Feca-Cult.

4. CONCLUSÕES

O Feca-Cult apresentou concordância de 95,4% com os resultados obtidos com a método para detecção de sangue utilizado rotineiramente em análises forenses. Pode-se ainda sugerir que foi mais eficaz, identificando aparentemente sangue humano em concentrações não detectáveis pelos outros métodos.

Deve-se analisar a concentração da substância hemática para se estabelecer qual o solvente mais adequado para cada situação. Em concentrações e

quantidades muito baixas de substância, o uso da água destilada fornece resultados mais sensíveis com o uso do Kit Feca-Cult, apesar de apresentar resultado falso-negativo no exame sorológico através do método de Coombs. Já a solução fisiológica e a salina tamponada podem ser utilizadas para as demais concentrações em ambos os testes.

O aço oxidado parece não afetar o resultado do Feca-Cult, o que nos sugere que o resultado negativo para Kastle-Meyer e positivo para Feca-Cult observado na comparação entre os três testes deve ser explicado pela hipótese mais parcimoniosa levantada, baseada na possível diferença de sensibilidade existente entre estes testes.

Deste modo, a análise em amostras suspeitas de sangue depositadas em peças criminais por meio do anticorpo anti-hemoglobina humana mostrou-se eficiente na detecção qualitativa de hemoglobina humana. Vale apontar como vantagem em relação aos demais testes específicos para sangue humano a rapidez do resultado e a facilidade de aplicação do teste imunocromatográfico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração técnica dos seguintes Peritos criminais do Núcleo de Biologia e Bioquímica, Helena Maria Ferreira Castro, Ione de Freitas Araujo, Ricardo Lopes Ortega, Rosely Galo Soares; Sonia Regina Eugênio Mazzoni, Maria Aparecida Avelino, Maria Luisa Almeida Prado Oliveira e Sousa, Roberta Hirschfeld Campolongo e, em especial, à técnica de laboratório, Sueli Felix dos Santos Oliveira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M.N. Hochmeister; B. Budowle; R. Sparkes; O. Rudin; C. Gehrig; M. Thali; L. Schmidt; A. Cordier; R. Dirnhofer. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci* 44: 597-602 (1999).
- [2] Feca-Cult One Step Teste: Membrana reativa para determinação de sangue oculto. Diadema: Alamar Tecno Científica Ltda. Bula do teste. (abr. 2008).
- [3] M.C.T. Sawaya; M.R.S. Rolim. Manual prático de medicina legal no laboratório. Juruá, Brasil (2009). 230p.
- [4] D.B. Dupré. Blood or Taco Sauce? *J Chem Educ* 73: 60-64 (1996).