

50524
87



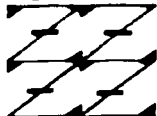
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**DETERMINACION DE GRUPO SANGUINEO EN
SANGRE SECA**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ROA GARCIA \ NORMA MINERVA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO SURMAMO FFE
DE NUESTRA REFLEXION

ASesor DE TESIS: Q.B.P. JOEL SAUCEDO CONSTANTINO

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENERO DE 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

ROA GARCÍA NORMA MINERVA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Determinación de grupo sanguíneo en sangre seca**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE O.B.P. JOEL SAUCEDO CONSTANTINO
VOCAL O.F.B. VALENTÍN ISLAS PÉREZ
SECRETARIO O.F.B. ROSALBA BARRERA MARTINEZ
SUPLENTE O.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO
SUPLENTE O.F.B. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ

[Handwritten signatures and stamps on a lined document]

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 5 de noviembre de 2002.

[Handwritten signature]
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

c c p Departamento de Control de Egresados
c c p Interesado

B

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Gracias Padre porque estas y estarás siempre a mi lado.

Especialmente a:

Mi Madre: María Paula Amada García García por haberme dado la oportunidad de vivir, de brindarme su amor y apoyo siempre.

Mi Madrina: María Antonia García García por su cariño y apoyo incondicional.

Mis Tíos: José Fernando García García, Jaime García, Mariano García, Socorro García, José Luis Hernández, por su apoyo incondicional.

Mi Esposo Luis Enrique Alvarado Valenciano y a mis hijos Karina Alvarado Roa, y el pequeño que esta por llegar, por el amor y apoyo que siempre me han dado y que me impulsa a seguir cada día.

A mis Suegros: Juana Valenciano y Jesús Alvarado, por la ayuda que me han brindado.

Con afecto a:

Mis Primas: Mercedes, Alejandrina, Aidee, Jazmín y Marilú, en quienes nunca he dejado de encontrar amistad y cariño.

A Heidi, que aunque no esta presente siempre esta en mi corazón.

Al Q.B.P. Joel Saucedo Constantino por su apoyo profesional.

Por esto y más Gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN
SANGRE SECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D

ÍNDICE

	Pag.	
INTRODUCCIÓN	1	
CAPÍTULO 1	ESTRUCTURA DEL TEJIDO SANGUÍNEO	3
CAPÍTULO 2	RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	5
CAPÍTULO 3	TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE	9
CAPÍTULO 4	DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN EL SISTEMA ABO	24
CAPÍTULO 5	TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SANGRE SECA	35
APÉNDICE	43	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E

INTRODUCCIÓN

La determinación del grupo sanguíneo en la práctica forense aporta a los tribunales, en no pocas ocasiones, elementos de prueba muy importantes tanto para señalar si una mancha de sangre recogida en el lugar de los hechos puede provenir de la víctima o bien del victimario o con mayor certeza indica, que no puede haber analogía entre la sangre encontrada y la de la víctima o la de su presunto agresor.

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 estas condiciones perduran durante algún tiempo y conservan la capacidad de combinarse con anticuerpos 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.

El método tradicional de absorción-inhibición, fue utilizado para tal fin durante varios años; este método es menos confiable, si se le compara con otras técnicas más recientes como lo es la de absorción-elución.

La técnica de absorción-elución 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 y para el sistema Rh.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Entre los indicios que frecuentemente se producen durante la comisión de diversos delitos, las manchas de sangre ocupan un lugar preponderante; de ahí la importancia de efectuar sobre esta evidencia física un estudio eficiente, que sea de verdadera utilidad para el esclarecimiento de los hechos que se investigan.

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 qué grupo sanguíneo pertenece?
4. ¿De qué persona es?

En el año de 1900 Karl Landsteiner, como producto de sus observaciones, determina que cuando la sangre de un individuo es mezclada con la de otro, podía causar la formación de gránulos de forma irregular de células rojas y/o hemólisis y descubre la existencia de los grupos sanguíneos del sistema ABO, que son hasta la fecha los grupos antigénicos de sangre humana más importantes.

Landsteiner, en colaboración con Miller, aporta el método clásico de absorción para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO, en manchas de sangre seca en 1925, método que es descrito por Wiener con el nombre de Técnica de Absorción-Inhibición y utilizado tanto para el sistema ABO, como para los Antígenos Eritrocitarios MN. Un poco más tarde, en 1939 en trabajos efectuados por Wiener se descubre el Sistema Rhesus (Rh).

Ducos y Reffia en 1954, demuestran la presencia de este sistema en sangre seca. (2)

TESIS CON
DE ORIGEN

CAPÍTULO 1

ESTRUCTURA DEL TEJIDO SANGUÍNEO

**TESIS CON
ORIGEN**

2-A

CAPÍTULO 1

ESTRUCTURA DEL TEJIDO SANGUÍNEO

La sangre es un tejido líquido que circula a través del cuerpo. Es la encargada de transportar el oxígeno a todo el organismo y de recoger el bióxido de carbono producido por los tejidos, para transportarlo al pulmón y ahí cambiarlo nuevamente por oxígeno. Constituye aproximadamente el 8% del peso corporal.

Está formada por:

I. Partículas sólidas, aproximadamente en un 50%.

a) Eritrocitos, células sin núcleo que se presentan en cantidad de 4.5 a 5 millones por milímetro cúbico. En su membrana o estroma, se encuentran los antígenos de los grupos sanguíneos, fosfolípidos, enzimas, etc., y en su interior contienen la hemoglobina, sodio y potasio entre otras sustancias.

En la membrana del eritrocito encontramos los antígenos de los grupos sanguíneos también llamados aglutinógenos. El grupo antigénico más inmunogénico es el sistema AB0 y le sigue el del sistema Rh °D.

b) Los Leucocitos o glóbulos blancos, en proporción de 5 a 10 mil por milímetro cúbico, están considerados como medios de defensa del organismo. Producen anticuerpos de varios tipos incluyendo anticuerpos de grupo sanguíneo.

c) Las plaquetas o trombocitos, en cantidad de 200 a 400 mil por milímetro cúbico, participan en la coagulación de la sangre. (3)

II. Fracción líquida o plasma que ocupa el 55% de su volumen. Esta fracción contiene numerosas proteínas, precipitinas, fibrinógeno, albúminas, globulinas y sales orgánicas. Desde nuestro punto de vista es importante ya que contiene entre las proteínas: precipitinas, fibrinógeno, albúminas, globulinas, dentro de las cuales están la IgG, IgM, IgD, IgE, e IgA y sales orgánicas. (3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El suero es la fracción líquida que se obtiene después de la coagulación de la sangre extravasada y se encuentra por lo tanto desprovista de fibrinógeno.

Varias enzimas (fosfoglucomatasa, fosfatasa ácida eritrocitaria, adenil cinasa y 6-fosfogluconato dehidrogenasa) y proteínas (hemoglobina y haptoglobinas), se utilizan también con fines forenses para tratar de individualizar una muestra de sangre por su frecuencia en la población. (3)

Los elementos descritos en la sangre nos permiten identificarla y efectuar la determinación del grupo sanguíneo eritrocitario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 2

**RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS
DE SANGRE**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4-A

CAPÍTULO 2

RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

“La imprescindible protección y conservación del lugar de los hechos, debe entenderse como la piedra fundamental de la investigación criminalística” nos dice el eminente criminólogo Dr. Rafael Moreno González y más adelante añade: “Para satisfacer tales exigencias es necesario que se haya respetado el lugar, y que la evidencia se haya fijado, levantado y embalado adecuadamente”. (4)

A continuación, se hará un relato detallado de la manera correcta de tomar muestras de sangre en el lugar de los hechos, después de que han sido adecuadamente fijadas mediante la descripción escrita, la planimetría y la fotografía. (4)

1. En el caso de encontrarse sangre líquida en el lugar de los hechos, deberá tomarse con ayuda de una pipeta Pasteur o de un gotero y depositarla en un tubo de ensayo, limpio y seco, al que deberá añadirse 1 mL de solución salina estéril al 0.85% por cada 5 mL de sangre.
2. Si no se encuentra sangre fresca, pero sí coágulos, se tomarán estos con el extremo de un aplicador de madera y se colocarán en el interior de un tubo de ensayo, procediendo después como en el caso anterior.
3. Si únicamente se localizaran manchas de sangre seca en objetos sólidos, se levantarán con pequeños fragmentos de 2 x 2 cm de tela blanca y limpia sin apresto, humedecidos con solución salina (0.85%). La tela se colocará también en un tubo de ensayo, para su envío al laboratorio. Con otro fragmento de tela, preparado de la misma forma, se tomará una muestra control de una zona del soporte no manchada con sangre.
4. Cuando las manchas se encuentran sobre cualquier tipo de tela, se recortarán porciones representativas de la muestra, así como un trozo de la misma tela, que no se encuentre maculado con sangre.

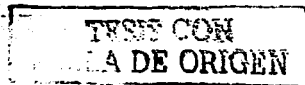
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5. Si se trata de manchas sobre vegetales, estos se recortarán y se colocarán en el interior de un sobre. Una porción no manchada del vegetal también será recogida en otro sobre.
6. La sangre que se encuentre sobre tierra o arena deberá recolectarse tomando un trozo completo del soporte, el que se depositará cuidadosamente en una bolsa de plástico que será colocada en una caja de cartón. También se tomará una muestra de tierra sin sangre y se empacará por separado.
7. Si la muestra problema se encontrara impregnada en cabellos, éstos se tomarán con pinzas y se trasladará al laboratorio dentro de pequeñas bolsas de plástico.
8. Finalmente, manchas de sangre presentes sobre el cuerpo de la víctima y de las que se sospeche no pudieran ser originadas por su propia sangre, serán tomadas como se describe en el punto 3. Además, se tomará sangre del cadáver, con el fin de compararla con la de las manchas.

Todas las muestras tomadas deberán llevar etiquetas firmemente adheridas, en las que se anotarán los datos concretos del caso:

1. Número de averiguación o expediente.
2. Fecha y hora en que se levantó la evidencia.
3. Sitio de donde se recolectó.
4. Naturaleza presunta del indicio.
5. Nombre del investigador que realizó el levantamiento y embalaje. (4)

La metodología criminalística utilizada en la identificación de sangre, es acorde al método científico, esto es, la comprobación de la hipótesis de trabajo, mediante las siguientes técnicas:



1.- TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN

- a) Reacción de la bencidina.
- b) Reacción de la fenoltaleína reducida.
- c) Reacción de la leucomalaquita verde.
- d) Técnicas espectroscópicas.
- e) Técnicas 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) Inmunolectroforesis cruzadas.

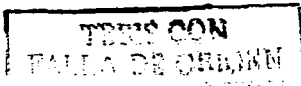
4.- DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO.

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

5.- DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS.

6.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN FORENSE. (4)

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 impregnado en prendas de vestir o sobre la superficie de objetos relacionados con algún hecho de sangre.



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-elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca y también se reporta que puede usarse para el sistema MN y para el sistema Rh, aun cuando se tiene el inconveniente, en el caso del MN, que sus antígenos son más difícilmente detectables por la no especificidad y mala calidad de los antisueros disponibles y en el caso del sistema Rh, se requiere de mayores cantidades de muestra por tener que estudiarse el Rh^oD, otros grupos del sistema y sus cinco subgrupos. (2)

La técnica de absorción-inhibición debe de 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 en saliva y líquido seminal, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble. (2)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 3

**TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN, CONFIRMACIÓN Y
DETERMINACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
SANGRE**

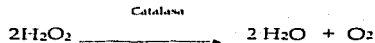
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

8-7

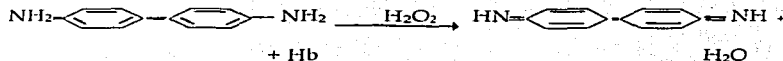
CAPÍTULO 3
TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE.

1.- Técnica de la Bencidina o de ADLER

Las peroxidasa sanguíneas son catalasas que, como su nombre lo 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 oxhidrilos 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
(incolora)

Bencidina oxidada
(azul)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La oxidación de la bencidina es utilizada como prueba presuntiva para la identificación de sangre. La técnica tiene una sensibilidad 1:300 000 a 1: 500 000. (2,6)

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 las de las peroxidasa 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
Zarzamora	Hígado	Permanganato de potasio
Alcachofa	Pulmón	Algunos blanqueadores
Papa	Saliva	
Nabo	Moco	
Remolacha	Pus	

Procedimiento

Humedecer un hisopo con agua destilada y frotarla sobre la mancha problema.

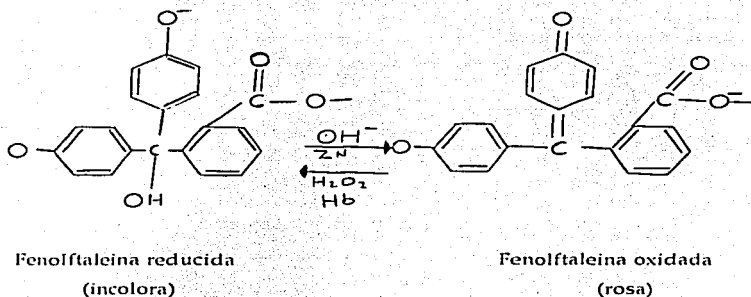
Añadir al hisopo 1 ó 2 gotas de solución de bencidina, después de unos momentos de observar que no dé coloración con ésta, poner la misma cantidad de H_2O_2 sobre el hisopo.

En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul. (2, 6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TÉCNICA DE LA FENOLFTALEINA O DE KASTEL - MAYER

Esencialmente la rige el mismo principio que se señaló para la reacción de Adler.



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 medio ácido.
- Se efectuará un calentamiento previo a 100°C durante un minuto.

Esta técnica de la fenolftaleína reducida es más sensible que la de la bencidina, siendo esta sensibilidad de 1: 1 000 000 a 1:10 000 000 (2, 6)

Procedimiento:

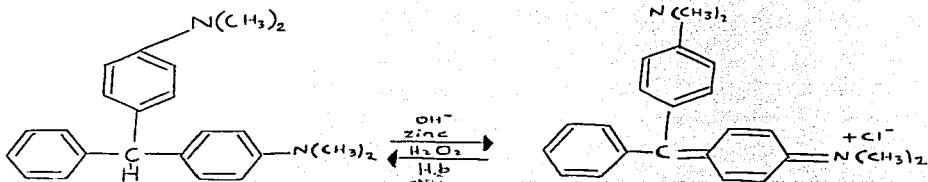
Humedecer un hisopo con solución salina, frotar la muestra problema y pasarlo a un tubo de ensayo con 2 ml de la misma solución, calentar un minuto a 100°C, añadir unas gotas de reactivo, esperar unos segundos y agregar agua oxigenada.

En caso positivo se obtendrá una coloración rosa brillante.

TÉCNICA DE LA LEUCOMALAQUITA VERDE

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 fenoltaleína. El prefijo "Leuco" se refiere a la forma reducida incolora de la malaquita verde.



Leucomalaquita verde reducida
(incolora)

Malaquita verde oxidada
(verde)

Como en el caso de la fenoltaleína, la forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada de color verde. Esta técnica fue reportada por Hunt, quien señala que la encontró más confiable para sangre, aunque menos sensible que la de la bencidina (17).

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. (2, 6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

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

La hemoglobina diluida en agua (oxihemoglobina) tiene 2 bandas de absorción en la zona del espectro visible cuyos máximos se encuentran a 575 y 340 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. 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 5 x 5 mm de tela de color blanco limpia, sin apresto, con la muestra problema.
2. Colocar la muestra así obtenida en el tubo de ensayo y añadirle 5 mL de agua destilada, dejándola reposar durante 10 minutos para lograr una eficiente extracción, pasado este tiempo, filtrar.
3. Efectuar un barrido espectral en la zona del espectro visible, se obtendrán 3 bandas de absorción: 2 finas a 575 y 540 nm y una banda ancha a 412 nm, este espectro corresponde a la oxihemoglobina.
4. Efectuar nuevamente la extracción de la muestra problema como se indica en el punto 2, pero utilizando en lugar de agua destilada, 5 mL de una solución de ferrocianuro de potasio al 0.5%. Al realizar el barrido espectral en la región visible, se obtendrá una banda a 630 nm, banda que corresponderá a la metahemoglobina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.

Para estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro ultra violeta-visible de doble haz provisto de monocromador. (2, 3)

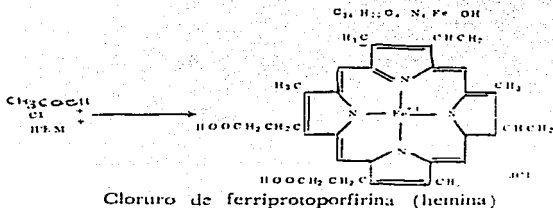
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN.

1. CRISTALES DE HEMINA O DE TEICHMANN

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:



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Procedimiento:

1. Colocar la muestra problema en el centro del portaobjetos y poner encima de ella un cubreobjetos.
2. Deslizar entre el portaobjetos y el cubreobjetos, por capilaridad unas gotas del reactivo de Teichmann.

3. Pasar por flama lentamente y a baja temperatura el portaobjetos hasta evaporación.

4. Dejar enfriar y observar al microscopio.

En caso positivo se observarán cristales romboides de color café oscuro de aproximadamente 1 a 20 micras. (2, 6, 7)

PRUEBA DE TAKAYAMA (HEMOCROMÓGENO)

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

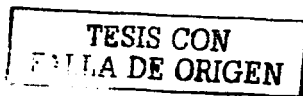
Tales compuestos incluyen otras proteínas, hidróxido de amonio, cianuro, nicotina, piridina y los productos resultantes se llaman hemocromógenos. Los cristales pueden formarse tanto en medio ácido como alcalino; sin embargo, el reactivo de Takayama es de naturaleza alcalina.

El hidróxido de sodio efectúa una hidrólisis alcalina, liberando el grupo prostético de la globulina; el hierro del hem en este momento se encuentra como ión férrico (Fe^{+3}) debido a la formación de metahemoglobina en el proceso de desecación de la mancha de sangre. La carga (Fe^{+3}) del hierro se neutraliza en el ión $-OH$. Calentando la glucosa (a azúcar reducida), se reduce el ión férrico a ferroso (Fe^{+2}) y la piridina se combina con éste para formar un producto cristalino insoluble: el hemocromógeno o piridinferroprotoporfirina. (2, 6, 7)

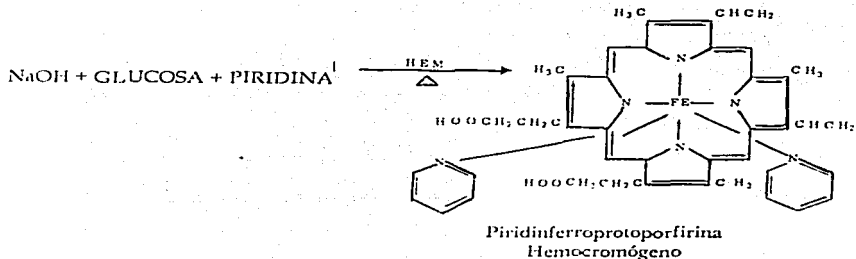
La prueba es más sencilla y sensible que la de los cristales de hemina y no se dan falsas reacciones positivas.

Procedimiento:

a) Colocar una pequeña cantidad de muestra problema entre un portaobjetos y un cubreobjetos.



- b) Deslizar por capilaridad unas gotas del reactivo entre portaobjetos y cubreobjetos.
- c) Pasar por flama el portaobjetos a baja temperatura durante 30 segundos.
- d) Observar al microscopio. En caso positivo de observarán cristales romboidales de color rojo al derredor de la muestra. (2,6,7)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL ORIGEN HUMANO DE LA SANGRE

La técnica de elección para determinar, si una mancha es de origen humano, es la reacción de las precipitinas descubiertas en 1900 por Uhlenhuth.

Las moléculas del anticuerpo (inmunoglobulina) reaccionan con el antígeno (proteína soluble) para formar un precipitado fácilmente visible bajo condiciones de luz apropiadas y a las concentraciones equivalentes de antígeno y anticuerpo.

Esta reacción antígeno - anticuerpo está influida por varias fuerzas interactuando entre los factores reaccionantes como son: las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción de los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática. La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno-anticuerpo soluble; conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a unirse y forma una tupida red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible.

Para que la reacción se lleve a cabo se requiere que la concentración del antígeno y del anticuerpo sean equivalentes; un exceso de alguno de los dos producirá un resultado negativo.

La reacción puede efectuarse observando la interfase entre los dos líquidos en un tubo de ensayo o en un capilar; también puede hacerse sobre gel por medio del fenómeno de difusión entre las partes reaccionantes, o bien por el método de electroforesis. La técnica deberá ser elegida según las necesidades y posibilidades.

La técnica de precipitinas en tubo o en capilar, tiene la ventaja de ser rápida y sencilla pero es necesario tener una muestra transparente. En ella debe efectuarse una cuidadosa estratificación en donde la capa de la solución del antígeno se encuentra sobre la preparación del anticuerpo.

TESIS CON
TALLA DE ORIGEN

La precipitación sobre gel tiene la ventaja de poder realizarse con el extracto de una mancha de sangre aunque éste sea turbio, requiere de muy pequeña cantidad de muestra, pero tiene como desventaja el emplear varias horas para que se efectúe la difusión.

La técnica electroforética tiene la ventaja de acelerar la difusión sobre el gel y por lo tanto disminuye el tiempo de reacción además de ser más sensible que las otras técnicas, pero requiere de un equipo más costoso. (2, 8)

FACTORES QUE AFECTAN LA REACCIÓN DE LAS PRECIPITINAS

Son varios los factores que pueden afectarla: la edad de la muestra; su exposición al aire, a la luz solar, a la humedad y a las altas temperaturas, el grado de putrefacción y la contaminación por compuestos químicos, tales como detergentes. Además la reacción debe efectuarse en condiciones óptimas de temperatura, de pH, de solubilidad de la muestra y de dilución del extracto obtenido de la muestra. Especialmente la edad y la putrefacción causan degradación de las proteínas de la sangre; la exposición al aire, a la luz solar y a la humedad, a menudo producen cambios por oxidación.

Un efecto observado a menudo en las manchas de sangre, es que cuando ha sido calentada, se requiere una gran cantidad de tiempo para disolverla, la precipitación es escasa y el tiempo de reacción se alarga y ello es debido a lo vulnerable que son las precipitinas al calor, el cual las desnaturaliza.

El lavado de manchas de sangre con agua que contenga jabón o detergente interfiere las reacciones positivas.

Es importante señalar que las proteínas séricas de una mancha de sangre seca son las responsables de las reacciones positivas de la prueba de las precipitinas y que algunos otros productos biológicos de origen humano también dan este resultado. El extracto de la mancha de sangre debe tener un pH casi neutro y la prueba debe de llevarse a cabo a la temperatura del laboratorio (aproximadamente 22°C).

Los extractos deben prepararse en el menor volumen posible, procedimiento que para algunas muestras requieren de 24 horas en refrigeración. El tiempo adecuado dependerá de las condiciones de la muestra y el título de la dilución deberá ser 1 : 1000.

TÉCNICAS DE PRECIPITINAS EN CAPILAR

Reactivos

1. Antisuero humano precipitante.
2. Solución salina fisiológica.

Procedimiento

Tomar un pequeño fragmento de la mancha y extraer en un tubo de ensayo de 12 x 75, con unas gotas de solución salina fisiológica; el tiempo requerido dependerá de la naturaleza de la mancha; normalmente se requieren de 1 a 2 minutos. Si la solución está turbia es conveniente centrifugar y utilizar el sobrenadante.

Dos gotas del extracto diluido se colocan en un tubo capilar (de tal forma que el líquido humedezca la pared del tubo por lo cual es preferible hacer esto con el capilar inclinado). Una cantidad igual de antisuero se absorbe en el mismo capilar de manera que quede abajo del extracto de la muestra. El tubo se fija perpendicularmente sobre el soporte. La observación se hace con luz indirecta y sobre fondo oscuro, la aparición de un anillo de precipitación en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.

El resultado se considerará positivo si la precipitación aparece antes de 20 minutos, después de ese tiempo el resultado deja de ser confiable. (2, 8)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Recomendaciones:

- Es conveniente una vez hecha la extracción, determinar el pH con papel indicador, si la reacción no es neutra, neutralizar con hidróxido de sodio NaOH al 0.1%, si la reacción es ácida hasta lograr un pH neutro, o con ácido clorhídrico al 0.1% si es alcalina.
- Si existen partículas en suspensión o turbidez, la muestra deberá centrifugarse hasta obtener un líquido transparente.
- La dilución de la muestra problema deberá tener una concentración 1 : 1000 misma que se controlará con un testigo a la misma dilución.
- No se recomienda hacer la extracción en medio tibio o caliente.
- En cuanto al antisuero precipitante aun cuando pueda ser preparado en el laboratorio, es preferible obtener productos comerciales ya que estos antisueros están avalados por un estricto control de calidad.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TÉCNICA DE INMUNOELECTROFORESIS CRUZADA PARA IDENTIFICAR SANGRE HUMANA

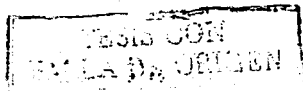
Esta técnica inmunoquímica se basa en las reacciones que se efectúan entre un antígeno que emigra anódicamente y un anticuerpo que emigra hacia el cátodo durante una electroforesis. Sobre una placa de agarosa se hacen horadaciones en pares; el antígeno (seroalbúminas, alfa y beta globulinas) se colocan en una de ellas y el anticuerpo (gammaglobulinas) en la otra; una vez terminada la electroforesis aparecen bandas visibles de precipitación entre las perforaciones pares de los materiales proteínicos específicos.

MATERIAL Y EQUIPO

1. Cámara de electroforesis.
2. Fuente de poder con control de voltaje hasta 500 V, 20 ma y control de tiempo.
3. Puentes de papel filtro u otro material absorbente.
4. Perforador y extractor de gel de aproximadamente 2 mm de diámetro.
5. Micropipetas graduadas.
6. Portaobjetos desgrasados y pulidos.

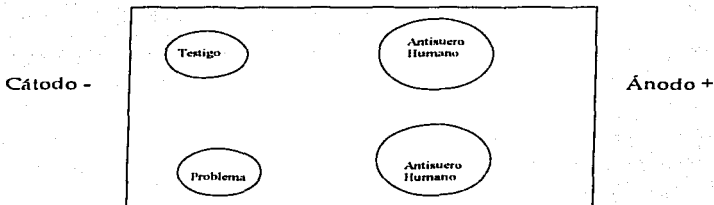
Reactivos:

1. Suero antihumano completo.
2. Agarosa.
3. Ácido dietilbarbitúrico.
4. Barbitol sódico.
5. Lactato de calcio.



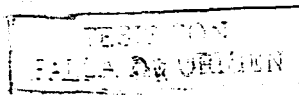
Procedimiento:

1. Colocar en uno de los compartimientos laterales de la cámara de electroforesis 100 mL de Buffer No 1. (ver apéndice)
2. Colocar los puentes de papel filtro u otro material absorbente adecuado en los compartimientos laterales.
3. Preparar el extracto de la muestra o muestras problema, suspendiéndoles un mínimo de 5 minutos en el Buffer No 2. (ver apéndice)
4. Colocar muestras problema, antisuero y testigo como se ilustra a continuación, colocando en cada horadación de 8 a 10 microlitros.
5. Una vez aplicadas las muestras contra su antisuero específico, se coloca la placa en la cámara de electroforesis, poniendo especial atención en que la polaridad sea correcta.
6. Trabajar a 150 V durante 45 minutos.



Interpretación:

Una vez terminado el periodo de corrimiento programado, observar y en caso positivo, las bandas de precipitación se harán visibles en la zona comprendida entre el antígeno y el anticuerpo.(2,8)



CAPÍTULO 4
DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN EL
SISTEMA ABO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 4 DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN EL SISTEMA ABO

El estudio sistemático de la composición de la membrana de los eritrocitos, el hallazgo de las diferencias existentes en dichas estructuras de membrana y las consecuencias debidas a esa diversidad de transfusiones sanguíneas, todo ello se debe a Landsteiner.

Landsteiner, inicia en 1901 un estudio riguroso al mezclar plasma y eritrocitos de diferentes colaboradores, analizando la existencia de aglutinación, lo que le lleva a clasificar en grupos los diferentes tipos de sangre.

En 1928, la Comisión de Higiene de la Sociedad de Naciones Unidas, acepta la nomenclatura que hoy en día se utiliza para el sistema ABO, conocido también comúnmente como grupo sanguíneo. (1)

A partir de los estudios de Landsteiner, durante la primera mitad del siglo XX, se ha avanzado en el conocimiento de otros componentes antigénicos de la membrana del eritrocito, estableciéndose numerosos sistemas eritrocitarios que hoy nos permiten evitar cualquier reacción de incompatibilidad al poner en contacto dos tipos de sangre. (tabla 4.1)

Conceptos generales

Antígeno eritrocitario: es toda estructura presente en la membrana del eritrocito que reúne las características necesarias (tamaño, complejidad, etc.) para que al ponerse en contacto con las células inmunocompetentes de un sistema inmunitario que lo reconoce como extraño de lugar a la activación de dichas células. Una de las respuestas producidas por la célula activada es la formación de anticuerpos.

Los antígenos eritrocitarios pueden estar en la membrana del eritrocito adheridos o formado parte integral de ella. Si forman parte integral de la membrana, suelen

estar menos accesibles para conectar con los receptores específicos para antígenos de las células inmunocompetentes, disminuyendo por este motivo su capacidad antigénica.

Tabla 4.1
Principales sistemas antigénicos eritrocitarios
con sus correspondientes alelos.

Sistema	Antígenos	Año descubrimiento
ABO	A ₁ , A ₂ , B, O	1900
MNSs	M, N, S, s	1927
P	P ₁ , P ₂	1927
Rh	D, C, E, c, e	1940
Lutheran	Lu ^a , Lu ^b	1945
Kell	K, k	1946
Lewis	Le ^a , Le ^b	1946
Duffy	Fy ^a , Fy ^b	1950
Kidd	Jk ^a , Jk ^b	1951
Diego	Di ^a , Di ^b	1954
Cartwright	Yt ^a , Yt ^b	1956
I	I, I	1956
Xg	Xg ^a	1962
Dombrock	Do ^a , Do ^b	1965
Colton	Co ^a , Co ^b	1965

La capacidad antigénica depende también del número de veces que se repite el antígeno en la membrana del eritrocito. Esto se llama densidad de puntos antigénicos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Algunos antígenos eritrocitarios se encuentran además en otras células y en secreciones. (1)

Los antígenos de los grupos sanguíneos son glucolípidos. Para cada grupo se conoce el azúcar inmunodominante al que se debe la especificidad inmunológica. Se trata de la N-acetilgalactosamina para el grupo A y la galactosa para el grupo B. Es evidente que los azúcares que diferencian estos grupos sanguíneos no son productos primarios de los genes ABO.

En la n-acetilgalactosaminiltransferasa y la galactosiltransferasa, las cuales transportan los azúcares n-acetilgalactosamina o galactosa sobre un "aceptor" que es la sustancia H (de la cual un azúcar inmunodominante es la fucosa) está considerada por un gen H situado en una unidad genética Hh independientemente de los genes ABO. (8)

A los antígenos eritrocitarios se les puede llamar factores, cuando varios factores son regulados por una serie de genes interrelacionados, forman un sistema. Ejem. Sistema ABO, formado por los factores A y B.

Sistema Rh, formado por los factores D, C, E, c y e.

SUSTANCIAS QUE COMPONEN EL SISTEMA ABO.

El sistema ABO, está compuesto por los aloantígenos A y B, que pueden estar presentes en la membrana del eritrocito, en otras células y en secreciones (saliva, líquido amniótico, líquido seminal, etc.), dependiendo su existencia y ubicación de un control genético.

Las sustancias A y B, empiezan a formarse en las primeras semanas del desarrollo fetal, pero no adquieren toda su potencia inmunogénica hasta pasados varios meses, incluso 18-20 meses después del parto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esto es debido a que el número de veces que se recibe la sustancia en la membrana del eritrocito al principio es reducido, adquiriendo su densidad máxima de una forma paulatina. La densidad de estos puntos antigénicos para las sustancias A y B puede llegar hasta un millón por célula.

En su composición podemos diferenciar 2 partes: una formada por oligosacáridos, donde se presentan las variaciones antigénicas y otra menos conocida, que podemos llamar soporte, formada por glucoproteínas, cuando el antígeno se encuentra en secreciones, o por glucolípidos cuando está fijado a la membrana de eritrocitos, leucocitos u otras células epiteliales o endoteliales. (1)

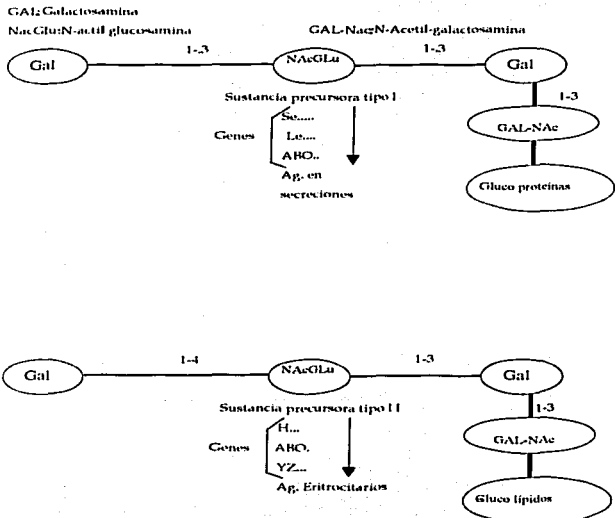
FORMACIÓN Y CONTROL GENETICO DE LAS SUSTANCIAS A Y B

Los antígenos que componen el sistema AB0 y el sistema Lewis proceden de sustancias precursoras muy similares.

Hay dos tipos de sustancias precursoras: Tipo I y Tipo II.

- Tipo I tiene todas las uniones entre los monosacáridos por los carbonos en posición 1 y 3, y el soporte formado por glucoproteínas también es el origen del sistema de Lewis. (1)
- Tipo II tiene todas las uniones entre los monosacáridos por los carbonos en posición 1 y 3, menos la existente entre la N-acetilglucosamina y la galactosa final, que se produce entre los carbonos en posición 1 y 4. El soporte está formado por glucolípidos. (Figura 4.1)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4.1 Sustancias precursoras tipo I y II

Sobre estas sustancias van a actuar una serie de enzimas transferasas controladas por genes que se encuentran en el cromosoma 9, dando lugar a distintos componentes de los sistemas ABO y Lewis.

Los genes que controlan el sistema ABO son: H, A, B y Se.

Los genes A y B son codominantes entre sí y dominantes sobre O.

La sustancia precursora tipo II es el origen de los antígenos A y B unidos al eritrocito y otras células.

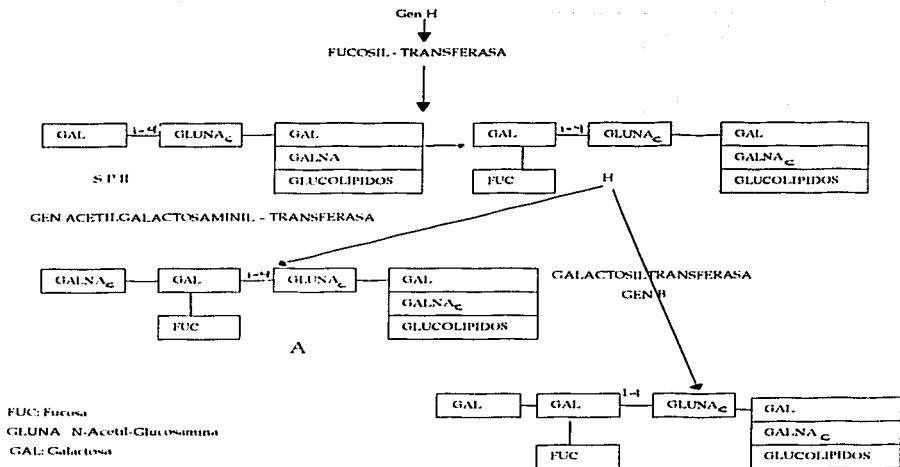
El gen A controla la formación y acción de un N- acetilgalactosaminiltransferasa, uniéndose una N-acetilgalactosamina a la sustancia H; así se forma la sustancia A.

El gen H controla la formación y acción de una fucosiltransferasa dando lugar a la unión de una fucosa a la galactosa final de la sustancia precursora de tipo II, formándose la sustancia H.

El gen B controla la formación y acción de una galactosiltransferasa, uniéndose una galactosa a la sustancia H, con formación de la sustancia B.

Si en la dotación genética no se encuentran los genes A y B, por ser homocigótico OO, sobre el hematíe no habrá sustancias ni A ni B, ya que el gen O, gen mudo, no controla ninguna transferasa que actúe sobre la sustancia H.

Los hematíes que tienen los antígenos A y B poseen menos cantidad de sustancia H en su membrana que los hematíes carentes de dichos antígenos, ya que parte de la sustancia H se utiliza en la formación de los antígenos A y B (Figura 4.2).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4.2 Formación de sustancias A y B a partir del gen H

En la especie humana, siempre que no existan alteraciones genéticas las sustancias precursoras y la sustancia H son isoantígenos, ya que las poseen todos los individuos de la especie. Sin embargo, las sustancias A y B son aloantígenos por que no se encuentran en todos los individuos pertenecientes a dicha especie. Existen otros genes menos conocidos (genes Z,Y) que mantienen fijos a los antígenos H, A y B en la membrana del eritrocito. (1)

Si en la dotación genética de un individuo existe el gen Se (de forma homocigótica, Se/Se , o heterocigótica, Se/se , este gen controla la formación y acción de una fucosiltransferasa, uniéndose una fucosa a la galactosa final de la sustancia H, sobre la que pueden actuar los genes A y/o B con formación de sustancias A y/o B en secreciones. Por lo tanto para que un individuo sea secretor de sustancias A y/o B, necesita poseer el gen Se de forma homocigótica o heterocigótica.

ANTICUERPOS DEL SISTEMA ABO

Al nacer, una persona posee en la membrana del eritrocito, los antígenos que le corresponden dependiendo de la dotación genética.

En su plasma no existe ningún tipo de anticuerpos respecto a las sustancias A y/o B, pero enseguida y de forma paulatina, se inicia la formación de anticuerpos contra los antígenos hemáticos que ella no posee. Estos anticuerpos se denominan naturales, y se forman como respuesta a sustancias que se encuentran en la membrana de determinadas bacterias, neumococos o que forman parte de algunos jugos vegetales. (1) Estas sustancias son muy parecidas a los antígenos que componen el sistema ABO. Los anticuerpos naturales reaccionan con antígenos A o B por reacción cruzada, son preferentemente de tipo IgM, no atraviesan la placenta, se les denomina también completos o aglutinantes porque, al unirse al eritrocito, lo aglutinan con facilidad en medio salino. (1)

Los títulos de anticuerpos naturales Anti-A o Anti-B pueden variar a lo largo de la vida. En términos generales, sangres tipificadas como O, tienen títulos de Anti-A y Anti-B naturales más altos que las de los grupos A y B.

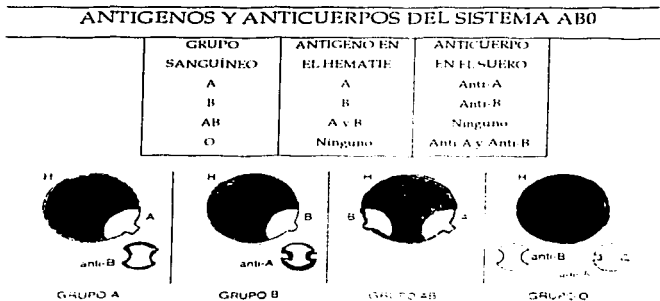
Cuando los eritrocitos tipificados como A, B o AB se transfunden a otra persona que no posea algunos de estos antígenos, el sistema inmunocompetente de ésta se estimula formando anticuerpos contra el antígeno desconocido.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Este tipo de anticuerpos se llaman inmunológicos, ya que el estimulante es perfectamente conocido y la unión antígeno anticuerpo no tiene lugar por reacción cruzada, la mayoría de estos anticuerpos inmunológicos son de tipo IgG y atraviesan la placenta. Se les denomina también incompletos porque para detectarlos en el laboratorio es necesario facilitar la aglutinación de diferentes formas, ya que en medio salino no se consigue. Es importante diferenciar entre anticuerpos Anti-A y Anti-B naturales e inmunológicos. (1)

GRUPOS Y SUBGRUPOS DEL SISTEMA ABO

El sistema ABO está constituido por cuatro tipos de grupos, como se observa en la figura 4.3



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.3 Antígenos y Anticuerpos de sistema ABO

Cada grupo presenta en el eritrocito, en otras células y en secreciones (si la persona posee el gen Se), el antígeno correspondiente a la denominación del grupo; y en el plasma, el anticuerpo contra el antígeno que no posee el eritrocito. (1)

En el grupo AB, al tener el eritrocito los dos antígenos, el plasma no presenta Anti-A ni Anti-B.

En el grupo 0, al no tener el eritrocito antígenos A y B, el plasma presenta Anti-A y Anti-B. El eritrocito expresa toda la sustancia H sin utilizar.

Se conocen algunas variaciones antigénicas que dan lugar a diferentes subgrupos (A₁, A₂, A₃, A_m, B₃, etc). Sólo los subgrupos A₁, A₂, A₁B y A₂B tienen interés, ya que el resto son muy poco frecuentes y sus antígenos tienen muy poca capacidad antigénica.

En la tabla 4.2, se indican los genotipos (dotación genética) y los fenotipos (caracteres genéticos expresados) del sistema AB0. (1)

El gen A₁ es dominante sobre el gen A₂. Los genes A y B son codominantes y dominantes sobre el 0.

Tabla 4.2 Fenotipos y genotipos del sistema AB0

Fenotipos	Genotipos
0	00 A ₁ A ₁
A ₁	A ₁ A ₁ A ₁ 0 A ₁ A ₂
A ₂	A ₂ 0 B0
B	B0
A ₁ B	A ₁ B
A ₂ B	A ₂ B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 4.3 se expone de forma completa las características del sistema AB0, mostrando los diferentes subgrupos. Se observa la existencia de los antígenos A₁ y A y sus correspondientes anticuerpos, así como una característica de los subgrupos A₂ y A₂B, es la ausencia del antígeno A₁.

El subgrupo A₁, es mucho más frecuente que el A₂ y su capacidad antigénica es más alta. Una persona con sangre tipificada A₂, si recibe eritrocitos A₁, es posible que forme anticuerpos anti-A₁. Los anticuerpos anti-A₁, procedentes de sangre A₂ y A₂B, suelen ser débiles y por tanto poco útiles para su uso in vitro con objeto de tipificar hematies A₁. (1)

Tabla 4.3
Características del sistema AB0

Grupo	Antígeno en el eritrocito	Anticuerpo en el plasma	Aglulina con:
A ₁	A ₁ , A	Anti-B	Anti-A ₁ , Anti-A
A ₂	A	Anti-A ₁ , Anti-B	Anti-A
B	B	Anti-A ₁ , Anti-A	Anti-B
A ₁ , B	A ₁ , A, B	-----	Anti-A, Anti-A, Anti-B
A ₂ B	A, B	Anti-A ₁	Anti-A ₁ , Anti-B
O	-----	Anti-A ₁ , Anti-A, Anti-B	-----

TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 5

**TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO
SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SANGRE SECA**

**TRABAJE CON
FOLIA DE ORIGEN**

34-A

CAPÍTULO 5

TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SANGRE SECA

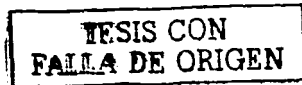
TÉCNICA DE ABSORCIÓN - ELUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE.

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

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. (2)

La técnica de absorción-elución debe ser empleada de todas maneras paralelamente a la de absorción-inhibición para la determinación de grupo sanguíneo en manchas de sangre seca, y por otra parte cabe señalar que la técnica de elección en las determinaciones de grupo del sistema ABH en saliva, líquido seminal y fluidos orgánicos, en los que el antígeno se encuentra en forma soluble es la de absorción-inhibición. (2)

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. Figura 5.1 (2)



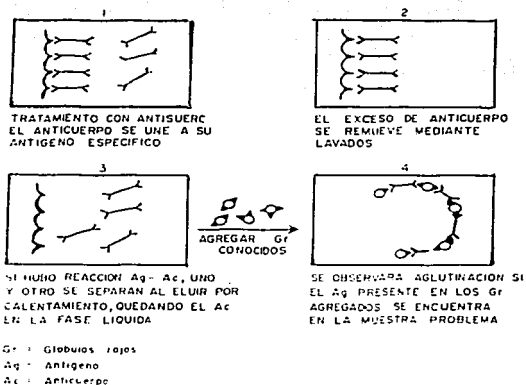


Figura 5.1 Técnica de absorción - elución

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 - elución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material empleado

1. Sueros hemoclasificadores Anti-A, Anti-B, Anti-AB y lectina Anti-H.
2. Metanol CH_3OH .
3. Fosfato ácido de sodio Na_2HPO_4 .
4. Fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 .
5. Cloruro de sodio NaCl .
6. Tubos de ensayo de 13 x 100.
7. Pipetas Pasteur.
8. Bulbos de goma.
9. Tijeras.
10. Aplicadores de madera.
11. Guantes desechables.
12. Tela estéril de algodón y sin apresto.
13. Gradillas para tubos de ensayo de 13 x 100.
14. Refrigerador.
15. Centrífuga.
16. Baño maría a temperatura constante.
17. Horno.

Procedimiento

1. Cortar 4 fragmentos de tela impregnada con sangre problema, que medirán 3 mm^2 (cuando la mancha problema no se encuentre sobre 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 la figura 5.2, columna que se marcará como problema.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. En la forma antes descrita se prepara otra serie de tubos, en cuyo interior se colocarán fragmentos de tela manchadas con sangre de grupo conocido: A, B, AB, y O, marcándose tal columna como 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 en una tercera columna asignada como control.
5. Obsérvese en la figura 5.2 cómo las hileras horizontales de la gradilla se marcarán:
Anti-A, Anti-B, Anti-AB y Anti-H, 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 Anti-B, suero Anti-B; a los de la hilera Anti-AB, suero Anti-AB y a los de la hilera Anti-H, lectina Anti-H.
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, 2 gotas de solución salina a temperatura ambiente.
11. Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C, durante 10 ó 15 min.
12. Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferente para cada tubo.
13. Agregar una gota de solución de glóbulos rojos lavados al 2% de la siguiente manera:

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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 O, a los tubos de la hilera H.

(problemas, control, testigo) Figura 5.2

14. Centrifugar durante treinta segundos a 3400 revoluciones por minuto.

15. Observar la presencia o ausencia de 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 el tubo problema de Anti-AB.
3. Si hay aglutinación en los tubos marcados: Anti-A, Anti-B y Anti-AB; pero no en la hilera signada como Anti-H, el grupo de la muestra analizada corresponderá al AB.
4. Si existe aglutinación en el tubo problema de la hilera Anti-H y simultáneamente en el problema de la hilera signada como Anti-A, el grupo en cuestión corresponderá al A₂.
5. Si no hay aglutinación en los tubos problema de las 3 primeras hileras, pero sí, en el de la hilera marcada como Anti-H el grupo sanguíneo corresponderá al O. (2,5)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	Problema	Testigo	Control
Anti-A	○	Ⓐ	○
Anti-B	○	Ⓑ	○
Anti-AB	○	ⒶⒷ	○
Anti-H	○	Ⓒ	○

Figura 5.2 Técnica de absorción-elución

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TÉCNICA DE ABSORCIÓN INHIBICIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE.

El material antigénico se coloca en contacto con su anticuerpo homólogo a fin de efectuar su absorción específica. El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas; es conveniente trabajar con testigos de grupo conocido.

Procedimiento.

1. Cortar fragmentos de tela impregnada de muestra problema (3 mm²) así mismo del control y testigos en hileras de tubos etiquetadas como: Anti-A, Anti-B y Anti-H
2. Poner tres gotas de cada uno de los sueros en sus respectivas hileras como se ilustra en la figura 5.3.

	Problema	Testigo	Control
Anti-A	0	0	0
Anti-B	0	0	0
Anti-H	0	0	0

Figura 5.3 Técnica de absorción-inhibición para la determinación de grupo del sistema ABO.

Interpretación de los resultados

1. Si se observa aglutinación con Anti-A y con Anti-B, pero no con Anti-H, el grupo será 0.
2. Si hay aglutinación en los tubos con Anti-B y con Anti-H, pero no en el de Anti-A el grupo será A₁.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Si no existe aglutinación con Anti-A ni con Anti-B, pero sí con Anti-H, el grupo es AB.
4. Si se obtiene aglutinación con Anti-B, pero no la hay con Anti-A ni con Anti-H, el grupo corresponderá al A₂.
5. Si se obtiene aglutinación con Anti-A y con Anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.

Ejemplo:

	Testigo negativo	O	A ₁	B	AB	A ₂
Anti-A	⊗	⊗	○	⊗	○	○
Anti-B	⊗	⊗	⊗	○	○	⊗
Anti-H	⊗	○	⊗	⊗	⊗	○

Aglutinación



Sin aglutinación



Figura 5.4 Interpretación de la técnica de absorción-inhibición para la determinación del grupo en el sistema AB0.

REGISTRO
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42-A

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE LA BENCIDINA O DE ADLER.

a) Solución de Bencidina:

0.25 g de Bencidina se disuelven en 175 mL de etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ y se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial CH_3COOH . Se guarda en un frasco gotero ámbar, en refrigeración en tanto no se usa.

b) Peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 3%; también en frasco gotero ámbar.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO PARA LA TÉCNICA DE LA FENOLFTALEINA O DE KASTEL - MAYER.

a) Solución de fenolftaleína:

Fenolftaleína	2 g
Hidróxido de potasio KOH	20 g
Agua destilada	100 mL
Polvo de Zinc	20 g

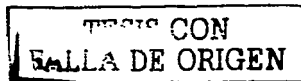
Disolver estas sustancias y colocarlas a reflujo con el polvo de zinc hasta completa decoloración.

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

b) Solución de trabajo

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

c) Solución de agua oxigenada al 3%.



PREPARACIÓN DE REATIVOS PARA LA TÉCNICA DE LA LEUCO MALAQUITA VERDE.

- a) Se prepara una mezcla sólida que contenga: 0.32 g 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 estabilidad.
- b) El solvente se prepara diluyendo 6.6 mL de ácido acético glacial en 3.3 mL de agua destilada.
- c) Preparar el reactivo de trabajo, inmediatamente antes de usarlo, disolviendo la mezcla sólida (a) en el solvente (b). Si en el reactivo recién preparado se observa la más leve coloración verde, no deberá ser usado.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO PARA LA TÉCNICA DE LOS CRISTALES DE HEMINA O DE TEICHMANN

Cloruro de sodio NaCl	0.1 g
Bromuro de potasio KBr	0.1 g
Ioduro de potasio KI	0.1 g
Ácido acético CH ₃ COOH c.b.p.	100 mL

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TAKAYAMA

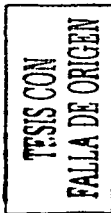
Una parte de solución saturada de glucosa.

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

Una parte de piridina (PM: 79.1).

Dos partes de agua destilada.

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



**PREPARACIÓN DE REACTIVOS PAR LA TÉCNICA DE
INMUNOELECTROFESIS
CRUZADA PARA IDENTIFICAR SANGRE HUMANA.**

1.- Buffer 1 para la cámara de electroforesis pH (8.6)

Ácido dietilbarbitúrico	1.38 g
Barbital sódico	8.76 g
Lactato de calcio	0.384 g
Agua deionizada c.b.p.	1000 mL

2.- Buffer 2 para el gel pH (8.6)

Acido dietilbarbitúrico	1.1 g
Barbital sódico	7.0 g
Lactato de calcio	1.0 g
Agua deionizada c.b.p.	1000 mL

3.- Gel

Pesar 2 g de agarosa (Difco Agar Especial) y añadir 100 mL de agua destilada, mezclar y agregar 100 mL de Buffer 2.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Sobre una superficie uniforme y perfectamente nivelada, colocar los portaobjetos y con la solución de gel, lo suficientemente caliente para facilitar su aplicación; dejar caer con una pipeta partiendo del centro de la placa 2.5 mL de gel, teniendo cuidado de que su distribución en la placa sea uniforme. Una vez solidificado el gel, acomodar las placas en una caja de plástico en cuya base se ha colocado una gasa húmeda para evitar la desecación del gel; conservarlas en refrigeración un mínimo de una hora hasta el momento de uso, las placas pueden almacenarse en estas condiciones aproximadamente durante un mes. También se pueden almacenar en el refrigerador tubos de ensayo conteniendo 7 mL de gel, para ser utilizado en el momento en que se requieran, licuándolos por calentamiento y aplicando el gel sobre la laminilla portaobjetos como se indica al principio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**PREPARACIÓN DE REATIVOS PARA LA TÉCNICA DE
ABSORCIÓN ELUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL
GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE SECA.**

1.- Buffer salino (solución estándar).

- a) Solución 1/15 M de fosfato ácido de sodio $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ (9.47 g /Lt).
- b) Solución 1/15 M de fosfato diácido de potasio $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ (9.08 g/Lt).

2.- Buffer final.

A 72 mL de la solución (a) añadir 50 mL de la solución (b) y 8.5 g de cloruro de sodio Q.P. Aforar a 1000 mL en un 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 buffer final.

Los sueros Anti-AB y Anti-H, se utilizan sin diluir.

**PREPARACIÓN DE LOS REATIVOS PARA LA TÉCNICA DE
ABSORCIÓN INHIBICIÓN PARA LA DETERMINACIÓN
DE GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE**

Solución Buffer.

Solución A) Preparar una solución de fosfato ácido de sodio ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) 1/15 M (9.47 g/Lt).

Solución B) Fosfato diácido de potasio ($\text{KH}_2 \text{PO}_4$) 1/15 molar (9.08 g/ Lt).

Buffer final: En un matraz volumétrico de 1000 mL de capacidad, colocar 72 mL de la solución A, 28 mL de la solución B y aforar con solución salina (8.5 g de cloruro de sodio NaCl en 100 mL de agua destilada), el pH final deberá ser de 7.2.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Preparación de los sueros

- Anti-A: Se diluyen 3.5 mL del suero con 450 mL del buffer final.
Anti-B: Diluir 1 mL del suero con 450 mL del buffer final.
Anti-H: Se utiliza sin diluir.

Nota: En este procedimiento, el antisuero debe ser preparado titulando el antígeno, ya que se prueba el anticuerpo residual, siendo por lo tanto de suma importancia la concentración inicial.

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS CONOCIDAS

Lavar tres veces con el buffer salino pH 7.2 y hacer una suspensión al 2% con eritrocitos conocidos de los grupos O, A₂ y B.

SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA (0.85%)

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio NaCl y disolver en 1000 mL de agua destilada.

TESIS CON
F. LA DE ORIGEN

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

48-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Casas A. Salve M. Laboratorio Clínico de hematología. España: Ed Mc Graw Hill, Interamericana, 1994: 320 -328.
- 2.- Franco M. Hematología forense. México: Ed Porrúa, 1999: 6 - 45.
- 3.- William D.S. Genética. California: Ed Mc Graw Hill, Interamericana, 1990: 25 - 34.
- 4.- Moreno G R. Criminalística. México: Ed Porrúa, 2000: 297 - 320.
- 5.- Química legal, Instituto de Formación Profesional . Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, México: 1999: 53 - 60.
- 6.- Secretores y no secretores del sistema AB0. Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal , México: 2001: 10 - 11.
- 7.- Jean F B. Inmunología. México: Ed Linusa, 1989: 535 - 540.
- 8.- Race RR,Sanger R. Blood groups in man, Oxford: Blackwell Scientific publications: 1975: 8 - 10.
- 9.- Klein HG. Standars blood banks and transfusion sevice. . 17 a ed. Bethesda. 1996: American Association of blood Blanks: 17 - 22.
- 10.- Vengelen , Tyler V. Technical manual. 12ª ED .Bethesda , American association of blood banks: 1996: 240 - 244.

ESTA TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 11.- Validation studies of and Immunochromatographic 1 step test for the forensic identification of human blood: *Journal of forensic sciencs*. 1999: 597 – 601.
- 12.- Islas PV. Estudio biológico y bioquímico de los indicios. México: Zaragoza: 2002: 98 – 103.
- 13.- Montiel. *Criminalística*. México: Limusa, 2000: 86 – 94.
- 14.- Vargas. *Medicina Legal*. México: Trillas, 1998: 40 – 46.
- 15.- Knight B. *Medicina forense de Simpson*. 2ª , México: El manual moderno. 1999: 45 – 51.
- 16.- Martínez. *Medicina legal*, 16ª .México: Méndez editores. 1991: 181 – 187.
- 17.- Hunt. A.C., et. al. *Journal of forensic medicine*. 1960: 110-111.
- 18.- Hamilton H, Rose M. *Manual de diagnóstico clínico*, México: Interamericana, 1985: 435-447.
- 19.- Race r, Sanger R. *Blood groups in man*, 6th ed. Oxford, Blackwell scientific publications: 1975:8-91.
- 20.- Klein H. ed *Standards for blood banks and transfusion services*. 17th ed. Bethesda: 1996: American association of blood banks: 17-32.
- 21.- Vengelen-Tyler V. Ed. *Technical manual*. 12th ed Bethesda, MD, American association of blood bankas: 1996:240-245.



- 22.- Culliford B. metropolitan Police. The examination and typing of bloodstains in the crime laboratory. Londres: 1971:84-85.
- 23.- Gradwohl's. Legal medicine. 3 era ed. Chicago: 1976: 154-162.
- 24.-López L. Técnica médica legal. Criminalística. Editorial Saber. Valencia: 1953: 25-145.
- 25.- Moreno. Cuestiones periciales. Porrúa, México. 1977: 31-35.
- 26.- Saferstein R. An introduction to forensic science. Criminalistics. New jersey: 1977: 247-262.
- 27.- Moreno. Los indicios biológicos del delito. INACIPE. México: 2000: 25-38.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**