

**“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS BLUESTAR FORENSIC FREE Y
THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN COMO PRUEBAS PRELIMINARES EN
LA INVESTIGACIÓN DE SANGRE DE INTERÉS FORENSE,
LBIF-INMLyCF, BOGOTÁ 2009”**

**LUISA FERNANDA ARBELÁEZ MURILLO
LINDA SORIETH RÍOS HERRERA**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de**

Bacteriólogas

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
Julio de 2009**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución Nº 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS BLUESTAR FORENSIC FREE Y
THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN COMO PRUEBAS PRELIMINARES EN
LA INVESTIGACIÓN DE SANGRE DE INTERÉS FORENSE, LBIF-
INMLyCF, BOGOTÁ 2009”**

**LUISA FERNANDA ARBELÁEZ MURILLO
LINDA SORIETH RÍOS HERRERA**

APROBADO

ROSA LILIA GUTIÉRREZ JARA
Profesional Especializado Forense INMLyCF
Directora de Tesis.

MARÍA IGNACIA CASTILLO AMEZQUITA
Profesional Especializado Forense INMLyCF
Jurado.

MARIA DEL PILAR MEDINA GOMEZ
Profesional Universitario Forense INMLyCF
Jurado.

**“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS BLUESTAR FORENSIC FREE Y
THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN COMO PRUEBAS PRELIMINARES EN
LA INVESTIGACIÓN DE SANGRE DE INTERES FORENSE,
LBIF-INMLyCF, BOGOTÁ 2009”**

**LUISA FERNANDA ARBELÁEZ MURILLO
LINDA SORIETH RÍOS HERRERA**

APROBADO

DRA. INGRID SCHULER GARCÍA
Decana Académica

DRA. LUZ AMPARO MALDONADO
Directora de Carrera Bacteriología

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a nuestras familias, en especial a nuestros padres Juan Carlos Arbeláez, María Murillo, Julio Cesar Ríos y Sol María Herrera, quienes han sido pieza fundamental en nuestra formación personal y profesional.

Padres, sus aspiraciones han tomado forma y se han convertido en realidad, hoy recogen el primer fruto de una labor que se ha venido cultivando poco a poco a lo largo de nuestras vidas, en el fondo de sus corazones hay satisfacción y en el de nosotras agradecimientos.

En este momento sienten en su interior orgullo y alegría, “por que el día de los padres, es el día de la victoria de sus hijos”.

Y hoy hemos triunfado nosotras sus hijas.

¡Los amamos!

AGRADECIMIENTOS

*Agradecemos en primera instancia a **DIOS** por darnos la fortaleza y oportunidad de finalizar con éxito nuestro trabajo de grado, a pesar de los tropiezos que se nos presentaron en el camino.*

*Al **Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses**, Regional Bogotá, por facilitarnos sus instalaciones durante la realización de nuestro proyecto de grado.*

*De igual manera, queremos agradecerle inmensamente a la **Doctora Rosa Lilia Gutiérrez Jara**, por su inquebrantable esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional a lo largo de este trabajo, sin importar las dificultades que se le presentaron.*

Por su ética, basada en el mantenimiento de la dignidad, del respeto ganado y el respeto debido; gracias a sus actos y pensamientos regidos por la ética, nos brindó la satisfacción y el orgullo de hacer las cosas bien hechas.

Por su voluntad, para que cumpliéramos nuestras metas, mejorando nuestras facultades y corrigiendo nuestros defectos.

Y por su responsabilidad, al enseñarnos que nuestros actos deben tener una justificación para que puedan ser defendidos.

¡Muchas Gracias Doctora!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Antecedentes.....	17
2.2 Manchas de sangre.....	25
2.3 Agentes oxido reductores.....	27
2.4 Peroxidasas.....	29
2.5 Catalasas.....	30
2.6 Reacciones de oxido reducción	31
2.7 Clases preliminares para la investigación de sangre de interés forense.....	31
2.7.1 Pruebas de orientación	32
2.7.2 Prueba de certeza.....	34
2.7.3 Pruebas específicas.....	36
2.7.4 Pruebas de individualización.....	37
2.8 Pruebas de orientación para la detección de manchas de sangre.....	39
2.8.1 Pruebas coloreadas.....	39
2.8.1.1 Técnica Thevenon Rolad-Piramidón.....	40
2.8.2 Pruebas quimioluminiscente.....	41
2.8.2.1 Bluestar Forensic Magnum.....	42
2.8.2.2 Bluestar Forensic Destroyer.....	43
2.8.2.3 Bluestar Forensic Free.....	44
2.9 Validación de Técnicas analíticas.....	46
3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	49
3.1 Formulación del problema.....	49
3.2 Justificación de la investigación.....	49

4	OBJETIVOS.....	52
	4.1 Objetivo general.....	52
	4.2 Objetivos específicos.....	52
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
	5.1 Diseño de la investigación y población de estudio.....	53
	5.2 Estudio a ciegas.....	54
	5.3 Criterios para la selección de muestras y de sustratos.....	54
	5.4 Selección y tratamiento de los sustratos o soportes.....	55
	5.5 Selección de las muestras.....	56
	5.6 Preparación de las manchas para muestras con sangre humana, animal, fluidos biológicos, productos químicos y vegetales.....	60
	5.7 Preparación de las sustancias inhibitoras.....	60
	5.8 Preparación de las diluciones.....	61
	5.8.1 Mancha de sangre pura.....	63
	5.8.2 Diluciones de las manchas de sangre.....	63
	5.9 Muestreo y codificación de las muestras.....	63
	5.10 Equipos.....	66
	5.11 Materiales.....	66
	5.12 Reactivos.....	67
	5.12.1 Thevenon Rolan-Piramidón.....	67
	5.12.2 Bluestar Forensic Free.....	67
	5.13 Preparación de reactivos.....	68
	5.13.1 Thevenon Rolan-Piramidón.....	68
	5.13.1.1 Alcohol etílico al 90%.....	68
	5.13.1.2 Solución de trabajo #1 Piramidón.....	68
	5.13.1.3 Solución de trabajo #2. Ácido acético Glacial al 1/3.....	69
	5.13.1.4 Solución de trabajo #3. Peróxido de hidrogeno al 3%.....	69

5.13.2	Bluestar Forensic Free.....	70
5.14	Procedimiento.....	71
5.14.1	Thevenon Rolan-Piramidón.....	71
5.14.2	Bluestar Forensic Free.....	73
5.14.2.1	Procedimiento de fotografía.....	74
5.15	Lectura e interpretación de resultados.....	75
5.15.1	Thevenon Rolan-Piramidón.....	75
5.15.2	Bluestar Forensic Free.....	75
6. RESULTADOS	77
6.1	Repetibilidad.....	81
6.1.1	Resultados de la repetibilidad para la Técnica de Thevenon Roland- Piramidón.....	81
6.1.2	Resultados de la repetibilidad para laTécnica de Bluestar Forensic Free.....	89
6.2	Reproducibilidad.....	97
6.2.1	Resultados de la reproducibilidad para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón.....	97
6.2.2	Resultados de la reproducibilidad para la Técnica de Bluestar Forensic Free.....	100
6.3	Limite de detección para las técnicas de Thevenon Roland- Piramidón y Bluestar Forensic Free.....	102
6.3.1	Limite de detección para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón.....	102
6.3.2	Limite de detección para la Técnica de Bluestar Forensic Free.....	103
6.4	Manchas sometidas a RapidSignal Occult Blood Cassette-Organics, previamente analizadas con Bluestar Forensic Free.....	104
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
7.1	Técnica de Thevenon Roland-Piramidón para los	

dos analistas.....	107
7.2 Técnica de Bluestar Forensic Free	109
para los dos analistas.....	
7.3 Índice de concordancia para la Técnica Thevenon	
Roland-Piramidón entre los dos analistas.....	110
7.4 Índice de concordancia para la Técnica Bluestar	
Forensic Free entre los dos analistas.....	111
7.5 Índice de Kappa para Thevenon Roland-Piramidón	
y Bluestar Forensic Free.....	111
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	114
9. CONCLUSIONES.....	124
10. RECOMENDACIONES.....	127
11. BIBLIOGRAFÍA.....	130
12. GLOSARIO.....	134
ANEXOS.....	138

TABLAS

1.	Universo de muestras para análisis	58
2.	Diluciones de sangre	63
3.	Codificación de las muestras para el estudio	64
4.	Resultados de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free	77
4.1	Lectura e Interpretación de resultados para Thevenon Roland-Piramidón	80
4.2	Lectura e Interpretación de resultados para Bluestar Forensic Free	80
5.	Agrupación de los resultados obtenidos según la tabla de 2 x 2 para datos estadísticos	81
6.	Repetibilidad para el Analista #1 / DÍA #1 (Piramidón)	81
7.	Repetibilidad para el Analista # 1/ DÍA #2 (Piramidón)	83
8.	Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #1 (Piramidón)	85
9.	Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #2 (Piramidón)	87
10.	Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #1 (Bluestar)	89
11.	Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #2 (Bluestar)	91
12.	Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #1 (Bluestar)	93
13.	Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #2 (Bluestar)	95
14.	Reproducibilidad para el Analista # 1 y # 2	97
15.	Reproducibilidad para el Analista # 1 y #2	100
16.	Limite de detección para diluciones de sangre en mancha (Thevenon Roland-Piramidón)	102
17.	Limite de detección para diluciones de sangre líquida (Thevenon Roland-Piramidón)	103
18.	Limite de detección para diluciones de sangre en mancha (Bluestar Forensic Free)	103
19.	Resultados de las manchas de sangre humana sometidas a RapidSignal Occult Blood Cassette – Organics, previamente analizadas con Bluestar Forensic Free	104
20.	Resultados para la Técnica de RapidSignal Occult Blood	106

21.	Cassette-Organics en diluciones de sangre humana líquida Resultados para la Técnica de RapidSignal Occult Blood Cassette-Organics en diluciones de sangre humana en mancha	106
22.	Interpretación de los valores del índice de concordancia y el índice de Kappa.	113
23.	Atributos comparativos de Thevenon Roland-Piramidón con otras regionales del país, INMLyCF	114
24.	Principales diferencias entre las técnicas Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free.	122

RESUMEN

Se realizó la validación de las técnicas **Bluestar Forensic Free** y **Thevenon Roland-Piramidón** en el Laboratorio de Biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses sede Bogotá; se utilizaron 100 muestra, dentro de las cuales se encontraron, sangre humana, sangre animal, fluidos biológicos humanos, productos vegetales, agentes químicos, sangres diluidas y sangre con diferentes sustancias que podrían inhibir su reacción, entre ellas la soda caustica, detergente, hipoclorito, limón y peroxido de hidrogeno. Las muestras se colocaron en diferentes soportes a manera de mancha, para conocer su reacción y su comportamiento en los diferentes sustratos.

Se hallaron los resultados estadísticos empleando una tabla de 2 x 2 como herramienta de análisis, estos resultados se tabularon en las casillas de la siguiente manera: (a) Verdaderos positivos, (b) Falsos positivos, (c) Falsos negativos y (d) Verdaderos negativos, datos con los cuales se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de concordancia e índice de Kappa; y se halló el límite de detección para las dos técnicas.

Finalmente se pudo concluir que las técnicas de Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón son altamente sensibles y medianamente específicas para la determinación de sangre en manchas, lo cual permite el uso forense como pruebas preliminares o de orientación y que se debe confirmar con técnicas de Individualización como ADN.

Palabras claves: Bluestar Forensic Free, Thevenon Roland-Piramidón, Sensibilidad, Especificidad, Reproducibilidad, Repetibilidad y Límite de Detección

ABSTRACT

We made the validate the techniques chemiluminescence **Bluestar Forensic Free** and colorimetric **Thevenon Roland-Piramidón** in the Biology Laboratory of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences Bogotá, 100 samples were find, among which are, human blood, animal blood, human biological fluids, plant products, chemicals, blood and blood mixed with various substances that might inhibit your reaction, including caustic soda, detergent, hypochlorite, hydrogen peroxide and lemon. The samples were placed in different media as a spot to hear their reaction and their behavior on different substrates.

For statistical analysis we used the 2 x 2 tables as a tool of analysis, these results are tabulated in boxes as follows: (a) true positive, (b) False positives, (c) False negative and (d) True negative data with which we calculated the sensitivity , specificity, positive predictive value, negative predictive value, and concordance index Kappa index, and is the limit of detection for both techniques.

Finally we may conclude that the techniques of Bluestar Forensic Free and Thévenon Roland Piramidón are highly sensitive and moderately specific, for the determination of blood on spots, This allows the use as forensic evidence or preliminary guidance and should be confirmed with techniques like DNA Individualization.

Keywords: Bluestar Forensic Free, Thévenon Roland-Piramidón, Sensitivity, Specificity, Reproducibility, Repeatability and Detection limits.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia se presentan un gran número de delitos en diferentes modalidades; la investigación de sangre ha tenido gran importancia como posible componente para la solución de casos criminales por medio del análisis con pruebas preliminares, de orientación, especie e individualidad con ADN.

La sangre encontrada en la escena del crimen se ha constituido como elemento esencial en el esclarecimiento de investigaciones judiciales. La selección y recolección de evidencias es de fundamental importancia a la hora de llevarlas al Laboratorio para su análisis.

Cuando llegan al Laboratorio de Biología Forense las manchas al parecer de sangre, el método de orientación es la prueba preliminar. En estos casos se precisa un alto conocimiento de estas técnicas, puesto que una elección inadecuada de la técnica a aplicar o una interpretación errónea del resultado, puede hacer perder el valor de un elemento de prueba que, finalmente puede ser trascendental.

Con la validación de estas dos técnicas, Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón, se pretende aportar en los estrados judiciales pruebas que sean realizadas con técnicas robustas, de alta sensibilidad, con altos parámetros de calidad que soporten la mas dura controversia jurídica.

Estas pruebas preliminares, facilitan al perito su trabajo, por ser fáciles de usar, económicas, tener un buen desempeño a la hora de implementarlos, no requiere condiciones inalcanzables para los profesionales forenses, facilitando el desarrollo del proceso pericial y la rápida acción por parte de las autoridades competentes.

2. MARCO TEÓRICO

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses llega un gran número de casos provenientes de homicidios, suicidios, muertes y lesiones accidentales, accidentes de tránsito, abuso sexual, violencia intrafamiliar y lesiones personales.

En Colombia en el año 2007 el INMLyCF, informó que se presentaron 16.318 casos de **homicidios** y en el 2008 fueron 15.251 los casos reportados, el 92% de las víctimas son hombres, lo que daría una relación de 12 hombres por cada mujer asesinada, se encontró que la población más afectada por este delito se encuentra en el rango de 18 a 34 años de edad. Con respecto a la incidencia de **suicidios** se determinó que para el año 2007 se presentaron 1.673 casos de los cuales 170 eran mujeres y 1.503 hombres, como resultado, se ve un incremento del 4% comparado con el 2008. Los **hechos accidentales** son una de las causas de morbilidad y mortalidad más comunes en nuestro país, en el año 2008 hubo 3.214 muertes y 8.394 heridos, 9 muertes más que en el 2007. En cuanto a **accidentes de tránsito** se registraron 5.670 muertes y 45.888 casos no mortales. Según las estadísticas del INMLyCF, aproximadamente una de cada cuatro mujeres sufren **violencia sexual** por un pariente y casi un tercio de los niños y adolescentes, siempre tienen su primera experiencia sexual de manera forzada, el Instituto informó que en el 2008 se realizaron 21.202 informes jurídicos, 929 casos más que en el año 2007. Dentro del proceso normal del desarrollo y evolución de una familia, se pueden encontrar situaciones de conflicto y crisis posibilitando un ambiente de interacción fundamentado en estrés y tensión en el grupo familiar, lo que puede desencadenarse en conductas inadecuadas denominadas **violencia intrafamiliar**, en el territorio Nacional, durante el año 2008 los servicios médico forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses evaluaron 72.849 víctimas

por violencia intrafamiliar. Del total de los eventos, el mayor porcentaje correspondió a casos de violencia de pareja 43.319 (59,4%), seguido por la violencia entre otros familiares 15.990 (21,9%) y se evaluaron 13.540 (18,5%) menores de edad, víctimas de maltrato de todos los reconocimientos hechos por los profesionales médico-forenses. En el 2008 se informó 126.869 casos por **lesiones personales**, según los médicos estas lesiones son las que más se solicita por el sistema jurídico, para el 2007 hubo una disminución de 6.606 casos, lo que indica que se redujo un 5%¹.

En la actualidad los casos que llegan al Laboratorio de Biología Forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias forenses, buscan analizar manchas de sangre siendo el componente más común en las evidencias a procesar, componente que tiene vital importancia y el cual ha hecho que se implementen técnicas confiables, reproducibles, económicas y de fácil procedimiento. Por ello, en este estudio se emplean dos pruebas preliminares en la búsqueda de sangre, Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón.

2.1 Antecedentes

El inicio de la Quimioluminiscencia se remonta al año 1928, en donde el alemán Albrecht de forma accidental, se encontró con una extraña combinación, que acababa de descubrir, el 5-amino-2, 3-dihidro-1, 4 ftalacindonia, una sustancia que emitía una luz tenue azul brillante al mezclarla con el peroxido de hidrogeno (H_2O_2) en presencia de un catalizador como el cobre (Cu II), el cobalto (Co III) o el hierro (Fe II). Si bien la bioluminiscencia se debía a la reacción en el desprendimiento de energía en forma de luz que se daba en la naturaleza, el hecho de poderlo realizar de forma artificial mediante químicos recibiría el nombre de **quimioluminiscencia**, término que comenzó a extenderse para referirse a

¹ INMLyCF. DRIP – Estadísticas. 2007, 2008. <http://www.medicinalegal.gov.co>

tal fenómeno. En 1937 repasando los conocimientos hasta el momento tanto de la química como de la medicina, el químico Walter Spech, de la Universidad de Medicina Legal y Criminalística de Jena (Alemania), comienza a usar el Luminol en distintos test de detección de sangre sobre superficies tales como pavimentos, ladrillos, paredes y otros objetos, encontrando una gran efectividad del Luminol al detectar sangre en la mayoría de las superficies; e incluso en aquellas superficies en las que previamente se habían limpiado hasta cinco veces. La iniciativa de Spech surgió por la escasa obtención de indicios y evidencias sanguíneas en las escenas de crímenes, puesto que los criminales manipulaban los elementos del lugar de los hechos eliminando cualquier tipo de restos biológicos².

En 1951 el Luminol ya se aplicaba en distintos casos como herramienta de refuerzo de la investigación criminal, a partir de aquí, el Luminol fue reconfigurado para una mayor efectividad y mejora tanto en sus resultados como en su utilización. En este mismo año, Grodsky intenta mejorar la fórmula de Alberch con una nueva mezcla a base de carbonato de sodio, perborato de sodio, luminol y agua destilada; esta mezcla se convirtió en la fórmula más utilizada por los investigadores para detectar rastros de sangre en la escena de un crimen. Sin embargo, el uso del carbonato de sodio produce una lenta reacción en el proceso de oxidación de la hemoglobina, por lo cual es de breve duración y de poca luminosidad. Por otra parte, una vez que los agentes reactivos se disuelven en el agua, la vida útil de la solución es muy corta, siendo esta fórmula muy inestable y tóxica, debido a la presencia del perborato de sodio. En 1966, Weber propone su mezcla para el Luminol: hidróxido de sodio o potasio en un medio hidratado de agua destilada y peróxido de hidrógeno, dando como resultado un luminol que aunque termolábil (sensible a cambios en la temperatura), y de una vida útil

2. **BUENDÍA RUBÉN.** Laboratorio de gwen. *Luminol: La confianza de un espectro.* 2008. <http://ellaboratoriodegwen.blogspot.com>

muy corta; ofrece una reacción luminosa que se puede fotografiar o filmar por una cámara de visión nocturna en total oscuridad³.

En el año 2000, Jean-Marc Lefebvre Despeaux, presidente de BlueStar, encargo a Loic Blum, Ph.D., profesor de bioquímica de la Universidad Claude Bernard-Lyon, encontraron una nueva fórmula que sería a base de luminol, que eliminaba todos los inconvenientes que anteriormente se habían presentado. Como resultado de ello, Blum descubrió esta nueva fórmula que fue posteriormente llamado BlueStar® Forensic⁴.

Hoy en día, hay dos variantes de obtención de Luminol aplicable a la investigación, por un lado la forma casera mediante la formula de Weber, por otro la forma comercial mediante los distintos preparados y presentaciones. La marca mas conocida actualmente es **Bluestar Forensic**, distinguida principalmente por haber eliminado parte del atraso en la reacción, por la facilidad en el manejo del producto en comprimidos y líquidos en envases idóneos para su uso y almacenamiento⁵.

DILBECK, LISA, señaló en su artículo, que el Bluestar Forensic está ahora disponible como un sustituto del Luminol, aunque el Bluestar Forensic es un luminol basado en sus funciones, pero sus propiedades son más conveniente para la escena del crimen, ya que no requiere completa oscuridad para la reacción, se mantiene la misma quimioluminiscencia después de cada aplicación y estudios realizados demuestran que no destruye el ADN⁶.

³ **BLUESTAR®**. Reactivo Revelador para Manchas de Sangre oculta. Ciencia Forense.cl Revista On-Line de Criminalística. 2009. <http://www.cienciaforense.cl/csi>

⁴ **M. DAWN WATKINS MS. CLPE. CSCSA. KING C. BROWN MS. CSCSA. CFPH.** BLUESTAR®. A Comparison of Visual Enhancement Chemicals for the Recovery of Possible Blood Stains at the Crime Scene. Blood Deteccion. www.bluestar-forensic.com/gb/download.php.

⁵ **EL INVESTIGADOR.** Una formula basada en el luminol. 2009. <http://policiasenlared.blogspot.com>

⁶ **DILBECK, Lisa.** Use of Bluestar Forensic in Lieu of Luminol at Crime Scenes. *Journal of Forensic Identification*. Journal of Forensic Identification, 2006. Páginas 56 (5).

M.C. NEGRE MUÑOZ, A. CASTELLÓ PONCE, P. GIL PITARCH Y F.A. VERDÚ PASCUAL, demostraron en su estudio, que el éxito de las pruebas de ADN, depende en gran medida de las técnicas de orientación que permiten la detección y el estudio previo de la muestra a analizar. En este trabajo se estudio la fiabilidad de las pruebas de orientación (Bencidina, Luminol, O-Toluidina y Fenolftaleína) sobre muestras contaminadas en el laboratorio con distintos productos. Los resultados arrojaron que es posible que la presencia de un contaminante impida la detección de sangre presente en una muestra; y esto puede ocurrir incluso en muestras con alta concentración de sangre. Las pruebas de orientación Bencidina, O-Toluidina y Fenolftaleína, dieron como resultado falsos negativos sobre muestras contaminadas; el luminol dio resultados positivos sobre muestras sometidas a lavados, permitiendo detectar y delimitar las zonas donde aún quedaban restos de sangre que a simple vista, no se observaban; destacándose por su mayor desempeño en el estudio en muestras sometidas a lavados⁷.

Entre otros estudios realizados en Brasil, **NEGRE, CASTELLO; GIL; VERD**, utilizaron pruebas presuntivas como Bencidina, Luminol, Fenolftaleína y O-toluidina para determinar sangre en manchas, empleando variantes como el tiempo y el almacenamiento de las muestras; la Bencidina y el Luminol fueron los reactivos más fiables, solo arrojan resultados dudosos con muestras que se mantuvieron al aire libre durante 12 meses; la Fenolftaleína y la O-toluidina fueron los reactivos que dieron deficientes resultados, la Fenolftaleína fue el reactivo menos sensible y la O-toluidina el menos específico. De los resultados obtenidos, se concluye que, en muestras forenses, la efectividad de una prueba depende del estado de la muestra, su antigüedad y grado de contaminación, entre otros⁸.

⁷ **NEGRE MUNOZ, M.C., CASTELLO PONCE, A., GIL PITARCH, P. ET AL.** *Bloodstains?: reliability of the presumptive test.* Cuadernos de medicina forense. 2003, No. 34. <http://scielo.isciii.es/scielo.php>

⁸ **NEGRE, CASTELLO; GIL; VERDU.** *Influencia del ambiente en el estudio criminalístico de muestras biológicas.* Revista Brasileira de Medicina Legal. Año 2004, Volumen II, No.1.

CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A, del Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Valencia, España, realizaron estudios de test presuntivos para sangre como Tetrametilbencidina, Verde de Leucomalaquita y Fenoltaleína. En este estudio, se comparo la efectividad de estos reactivos en muestras diluidas a diferentes concentraciones y contaminadas con acido ascórbico. De estas pruebas se obtuvo que la adición del acido ascórbico sobre las manchas de sangre a estudiar, producen falsos negativos. Los resultados obtenidos para las muestras de sangre contaminadas con Acido Ascórbico fueron: la Tetrametilbencidina dio resultados positivos hasta 1/200.000, la O-toluidina y el Verde de Leucomalaquita dieron resultados positivos hasta 1/20.000 y la Fenoltaleína dio resultados positivos hasta 1/200, estos efectos se evaluaron comparando los resultados obtenidos por diferentes reactivos, tanto en sangre en manchas como en sangre líquida⁹.

Estudios realizados por **CASTELLÓ PONCE, M. ALVAREZ SEGUI, M. MIGUEL FEUCHT Y F.A VERDÚ PASCUAL**, analizan la sensibilidad del Luminol para encontrar manchas de sangre invisibles, que han sido lavadas para tratar de eliminar los vestigios de esta. Los resultados mostraron que se puede extraer y amplificar DNA en las muestras sometidas a 1, 2, y 3 lavadas, y que el luminol es muy eficaz para detectar indicios invisibles de sangre y manchas de estas que han sido lavadas hasta 10 veces¹⁰.

Los autores **MR. VILLEGAS, ML. ACEVEDO, J. MIRANDA Y EA. PINTO**, en su estudio, "Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA", evaluaron las pruebas

⁹ **CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A**. *Critical revision of presumptive tests for bloodstains*. Department of Legal Medicine. College of Medicina and Odontology univetsity. Valencia, España. Forensic science communications. Julio de 1999, volumen 1, No.2.

10. **CASTELLÓ PONCE ANA, VERDÚ PASCUAL FERNANDO, ALVAREZ SEGUI, FEUCHT MIGUEL**. *Development of Latent stains: effectiveness of luminol and evaluation of its effect on DNA analysis*. Cuadernos de Medicina Forense. Sevilla, España. 2002.

presuntivas de Piramidón, Luminol y Fenolftaleína con el fin de determinar su sensibilidad e interferencia, frente a diferentes condiciones de soporte, temperatura y ambiente. Además se evaluaron las mismas condiciones para los test de Takayama, Inhibición de la aglutinación y Absorción-elución que determinan el origen de la sangre y tipifican su grupo sanguíneo. Se demostró que tanto las pruebas presuntivas como las confirmatorias no se ven afectadas en su mayoría al variar los soportes, la temperatura o las condiciones ambientales bajo las cuales fueron almacenadas. Respecto a la sensibilidad, se encontró que es mayor en las pruebas presuntivas en comparación con las pruebas confirmatorias, ya que estas requieren de muestras que no hayan sido sometidas a diluciones o lavados¹¹.

Los siguientes autores **SHANAN S, TOBE, M.SC; NIGEL WATSON, PH.D; Y NIAMH NIC DAEID, PH.D**, en su estudio utilizaron el Luminol, el Verde de Leucomalaquita, la Fenolftaleína y el Bluestar como pruebas presuntivas para la detección de manchas de sangre. Se hicieron diluciones desde 1/10.000 hasta 1/10.000.000 de sangre con productos para el hogar, fluidos humanos y químicos (saliva, semen, salsa de tomate, cebolla, frijol rojo, rábano, papa, tomate, ácido ascórbico, cloro al 5 %, sulfato cúprico al 10%, sulfato férrico al 10% cloruro de níquel al 10%) para conocer el límite de detección de cada prueba. Los resultados arrojaron que la prueba Verde de Leucomalaquita tuvo una sensibilidad de 1/10.000 y para el resto de las técnicas la sensibilidad fue de 1/100.000. De este estudio se concluye que se pudo recuperar DNA amplificado de las técnicas Luminol, fenolftaleína y Bluestar, pero no de la técnica de Verde de Leucomalaquita de las muestras manchadas¹².

¹¹ **MR. VILLEGAS, ML. ACEVEDO, J. MIRANDA Y EA. PINTO.** *Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses.* Cuadernos de Medicina Forense. Octubre 2005. 11(42): 267-274.

¹² **SHANAN S, TOBE, M.SC; NIGEL WATSON, PH.D; Y NIAMH NIC DAEID, PH.D.** *Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA.* Forensic Sci, January 2007, Vol. 52, No. 1. www.blackwell-synergy.com

L. J. BLUM, PHILIPPE ESPERANCA, STEPHANIE ROCQUEFELTE, revelan las propiedades del Bluestar, entre ellas la conservación del ADN. El Bluestar es un agente quimioluminiscente para la detección de manchas de sangre, que a la hora de su preparación no tiene riesgos para la salud y tampoco efectos mínimos para alterar el ADN. Obtuvieron con la mezcla de Bluestar la detección de sangre oculta en áreas de lavado, sin importar si el sustrato es poroso o cualquiera que sea el agente de limpieza utilizado, arrojando resultados positivos, la reacción de quimioluminiscencia se observó bajo condiciones de poca luz¹³.

WEBB SAMANTHA, comparó el Luminol y el Bluestar como pruebas presuntivas para detectar manchas de sangre, en el estudio querían determinar: (1) Si la edad o la temperatura a la que estuviera la mancha de sangre afectaba los resultados, (2) Si una vez limpiadas las manchas de sangre se podían observar con Luminol y Bluestar y (3) Si se adicionaba cloro a los sustratos se producían interferencias. Y concluyeron que la edad y la temperatura a la que estaban expuestas las manchas no impidieron la detección de sangre, se determinó que la quimioluminiscencia del Bluestar es más duradera y brillante que la del Luminol, y que se detectaron manchas de sangre a pesar que tenían cloro; la sangre no fue detectada en los sustratos en diluciones de 1/100000 y 1/1000000¹⁴.

GROSS ANN MARIE; HARRIS KATY AND KALDUN GARY, diseñaron este estudio para poner a prueba los siguientes factores que participaban en el procesamiento de sangre tratados con las pruebas del luminol: (1) La

¹³ **L. J. BLUM 1, PHILIPPE ESPERANÇA 2 , STÉPHANIE ROCQUEFELTE**. *New high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence*. Forensic Sci. 2006. Vol. 39. No 3 pp. 81–100.

¹⁴ **WEBB SAMANTHA**, Criminalist Saint Louis Metropolitan Police Department, *Luminol vs. BlueStar®: A Comparison Study of Latent Blood Reagents*.

reactividad química de las pruebas de color, fenolftaleína y Tetrametilbencidina a raíz de la aplicación de la luz que emite el Luminol, (2) El efecto de diferentes productos de limpieza en los distintos sustratos con el Luminol, (3) El efecto de diferentes productos de limpieza en los diferentes sustratos y la capacidad de obtener ADN adecuado para la prueba de PCR, y (4) La capacidad del luminol para la extracción del ADN en muestras analizadas. Los resultados indicaron que el luminol no interfiere negativamente en las pruebas de PCR, Se determinó que el sustrato y el método de limpieza fueron los principales factores que afectaron el rendimiento del ADN y la capacidad para detectar ADN por medio de la PCR¹⁵.

JAKOVICH CATHY, realizó el estudio sobre el Luminol y la Fluoresceína que son productos químicos frecuentemente utilizados para las pruebas presuntivas para visualizar sangre asociados con escenas de crimen. Un nuevo producto químico, Bluestar, está ahora disponible para el mismo propósito. La investigación demostró que el Luminol y la fluoresceína no interfieren con el análisis de STR, pero pocas investigaciones se han hecho para demostrar el efecto de Bluestar, en su caso, en el análisis del ADN. En este estudio, las alfombras manchadas de sangre que fueron rociadas con luminol, fluoresceína, y Bluestar se analizaron por STR. Completo los perfiles de los 13 principales CODIS STR se obtuvieron a partir de hisopos de cada alfombra, lo que demuestra que Bluestar, como luminol y fluoresceína, no inhibe el análisis de STR¹⁶.

¹⁵ **GROSS ANN MARIE; HARRIS KATY AND KALDUN GARY**, *The Effect of Luminol on Presumptive Tests and DNA Analysis Using the Polymerase Chain Reaction*, Journal of Forensic Sciences, 1999; Páginas:837–840.

¹⁶ **JAKOVICH CATHY**. *STR Analysis Following Latent Blood Detection by Luminol, Fluorescein, and , BlueStar*. Laboratory of San Diego, CA. Journal of Forensic Identification 2007. Páginas: 57 (2).

French Defense Department Gendarmerie Nationale Criminal Research Institute Biology Department, comentaron sobre lo fundamental de la escena del crimen, la morfología bioquímica y el análisis genético en el transcurso de las investigaciones basados en pruebas de sangre. Los expertos analizan la evidencia biológica, incluida la sangre para identificar su origen y luego compararla con las muestras de la víctima o el culpable. Existen dos categorías: (1) Reactivación de las proteínas y los aminoácidos y (2) Una evidencia de actividad enzimática. Algunas de estas técnicas; Bencidina, Verde de Leucomalaquita, Cristal violeta, Luminol y fluoresceína fueron suspendidas por la dificultad de la preparación en el lugar de la escena. Además los estudios muestran que estos químicos no sirven para pequeñas cantidades de ADN. Hoy en día una de las técnicas más usadas es Bluestar ya que es uno de los reactivos más comunes en las escenas de crimen por todas sus características: se ve en oscuridad, no importa si hay pequeñas cantidades de muestra, se reactiva con productos de hogar como detergentes, entre otras¹⁷.

2.2 Manchas de Sangre

En las investigaciones de los delitos en donde está implicada la violencia, así como también ciertos delitos contra la integridad de las personas; la sangre constituye una prueba de gran valor y es la que con mayor frecuencia puede presentarse. Los restos de sangre pueden aparecer en el lugar del delito en forma líquida o como una mancha¹⁸.

En la práctica se encuentran a menudo manchas que por su aspecto general, su forma y su coloración son semejantes a manchas de sangre, pero también

¹⁷ **French Defense Department Gendarmerie Nationale Criminal Research Institute Biology Department**. *The effect of the BlueStar Blood reagent on DNA typing, 2001*. <http://www.bluestar-forensic.com>.

¹⁸ **VARGAS DUEÑAS EVARISTO**. *Biología Forense. Fluidos del cuerpo humano*. Manual de criminalística. Primera Edición. Editorial Señal Editora. 2000. Capítulo XI, Páginas 200.

se debe tener presente que las características macroscópicas de las manchas de sangre son insuficientes para diferenciarlas de falsas manchas que tienen la misma apariencia, así las manchas de frutas, jugos, vegetales, vinos, manchas de tinta roja, de pintura, labial, etc., pueden semejar a reales manchas de sangre. Las manchas de sangre tienen aspectos diferentes según sean recientes o antiguas y también depende del soporte en el que se encuentren. Estas pueden ser de sangre fresca, de color rojo vivo y al caer sobre la superficie absorbente se difunden fácilmente de manera que van cambiando de color con el transcurso del tiempo, tomando así un color más oscuro o negruzco debido a la transformación de la hemoglobina en hematina por acción del oxígeno del aire. Toda mancha de sangre descubierta debe ser protegida de la contaminación, humedad y temperatura. En casos de telas oscuras como paños, la mancha al difundirse en el tejido, puede presentar diferentes tonalidades y llegar el caso de confundirse con el material de soporte y pasar desapercibida, al realizar el examen macroscópico. Si la sangre cae sobre un material poroso, como un ladrillo, cemento, madera, el color original puede alterarse debido a la absorción de la sangre en la escotadura del soporte. Cuando la mancha está sobre un soporte no absorbente, forma costras con aspecto de escamas brillantes a agujas y estas, se pueden observar mejor si las buscamos con luz indirecta oblicua. Si las manchas han sido lavadas con agua, el color se hace rosa, el pigmento difunde el tejido, dando lugar a una forma irregular con lugares más densos que otros. El aspecto aparente es como el de una mancha que ha sido lavada, y puede dar lugar a causas de error en la investigación, por la presencia de sustancias, como ácidos y detergentes que modifican las características estructurales de la mancha. Sin embargo hay manchas que pueden parecer no ser sangre y al efectuar los diferentes análisis, se comprueba que sí son¹⁹.

¹⁹ VARGAS DUEÑAS EVARISTO. *Biología Forense. Fluidos del cuerpo humano*. Manual de criminalística. Primera Edición. Editorial Señal Editora. 2000. Capítulo XI, Páginas 203, 204.

En la actualidad, una vez que llega la muestra al Laboratorio, se les practican pruebas preliminares. Estas pruebas son altamente sensibles, por lo que permiten demostrar trazas de sangre en pequeñas cantidades, pero carecen de especificidad²⁰.

2.3 Agentes Oxido y Reductores

Entre los agentes oxidantes se encuentra el Hierro un metal, símbolo Fe, número atómico 26 y peso atómico 55.847, es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (5%), es maleable, de color gris plateado y magnético. Es fundamental en el metabolismo celular, ya que forma parte de la estructura de grandes números de proteínas, con importantes funciones biológicas (hemoglobina, mioglobina y enzimas como las catalasas y las peroxidasas). Estas proteínas dejan de sintetizarse o carecen de acción biológica si no es en presencia de unos niveles de hierro adecuados²¹.

El hierro es indispensable para la formación de la hemoglobina, sustancia encargada de transportar el oxígeno a todas las células del cuerpo. En el organismo, el hierro se encuentra principalmente en la sangre, pero también en los órganos y en los músculos²².

El hierro de los alimentos se halla prácticamente siempre formando complejos con otros compuestos y es liberado en el proceso de la digestión, su absorción se da en el duodeno, por lo cual es necesario que este en estado reducido o ferroso. El hierro plasmático no se halla nunca en forma libre, sino unido a la transferrina, una glicoproteína de 83.000 Daltons capaz de fijar un máximo de 2 átomos de hierro y transportarlo por el organismo. La

²⁰ Ídem No 19, Página 205.

²¹ **BLUESTAR FORENSIC.** *El mejor revelador de manchas de Sangre oculta en la escena del crimen.* Madrid, España. www.bluestar-forensic.com

²² **LENNTECH.** Hierro, 2008. <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Fe.htm>

transferrina solo fija el hierro cuando se halla en estado oxidado o férrico; en condiciones fisiológicas o de normalidad²³.

El peróxido, es un compuesto químico que contiene dos átomos de oxígeno enlazados, O-O. Pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno gaseoso están naturalmente en el aire. El peróxido de hidrógeno es inestable y se descompone rápidamente a oxígeno y agua con liberación de calor. Aunque no es inflamable, es un agente oxidante potente que puede causar combustión espontánea cuando entra en contacto con materia orgánica, se encuentra en bajas concentraciones (3-9%) en muchos productos domésticos, productos medicinales, en blanqueadores de ropa y productos para cabello; en la industria se usa en concentraciones más altas para blanquear telas y papel, como componente de combustibles para cohetes, para fabricar espuma de caucho y sustancias químicas orgánicas. Entre otros agentes oxidantes se encuentran: Oxígeno, Ozono, Flúor, Cloro, Bromo, Yodo, Hipoclorito, Clorato, Ácido nítrico, Permanganato, entre otros²⁴.

Los agentes reductores son elementos de transición que presentan múltiples valencias o estados de oxidación. Los elementos de transición tienen las propiedades típicas de los metales: son maleables, dúctiles, conducen el calor y la electricidad, y tienen un brillo metálico. Tienden a actuar como agentes reductores (donantes de electrones), pero son menos activos en este sentido que los metales alcalinos. Estos agentes de transición tienen por lo general densidades y puntos de fusión elevados y presentan propiedades magnéticas; forman enlaces iónicos y covalentes con los aniones (iones cargados negativamente) y sus compuestos suelen tener colores brillantes.

²³ **RAFAEL MONGE ROJAS.** Guía alimentarias para la educación nutricional, Hierro. Costa Rica. <http://netsalud.sa.cr/guiasalimentarias/hierro.pdf>

²⁴ **ALVIANO NESTOR.** Toxicología Laboral: Criterios para la vigilancia de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp>

Dentro de los agentes reductores se encuentran: Flúor, Hidroxilo, Oxígeno, Peróxido de hidrogeno, Permanganato, Dióxido de cloro, Hipoclorito, Cloro, Bromo, Yodo, Carbón, Monóxido de carbono, Azufre, Fósforo, Cobalto, Níquel, Aluminio, Magnesio, Sodio, Potasio, sustancias que contengan celulosa como la madera, textiles entre otros²⁵.

2.4 Peroxidasas

Son enzimas muy extendidas en toda la escala filogenética, reaccionan utilizando un peróxido como oxidante. Se presentan en vegetales como el rábano y en animales, existen peroxidasas con una función predominantemente defensiva en la saliva, la leche o los leucocitos, donde se aprovecha el carácter oxidante de estas, con fines germicidas y bactericidas. No todas las peroxidasas son defensivas, una peroxidasa es también la responsable de la síntesis de las hormonas tiroideas, oxidando en este caso el yoduro a yodo para que éste se adicione a algunos de los anillos fenólicos de los residuos de tirosina de la tiroglobulina. Otras peroxidasas, como la glutatión peroxidasa, están ampliamente distribuidas en diversos tejidos con fines diferentes, pero relacionados con una función antioxidante. La mayoría de las peroxidasas son hemoproteínas y tienen como sustrato común el (H₂O₂) peróxido de hidrógeno. La gran afinidad por este sustrato hace que se pueda unir al hierro del grupo Hem de la hemoglobina, dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato²⁶.

Las peroxidasas también se utilizan como biocatalizador para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas,

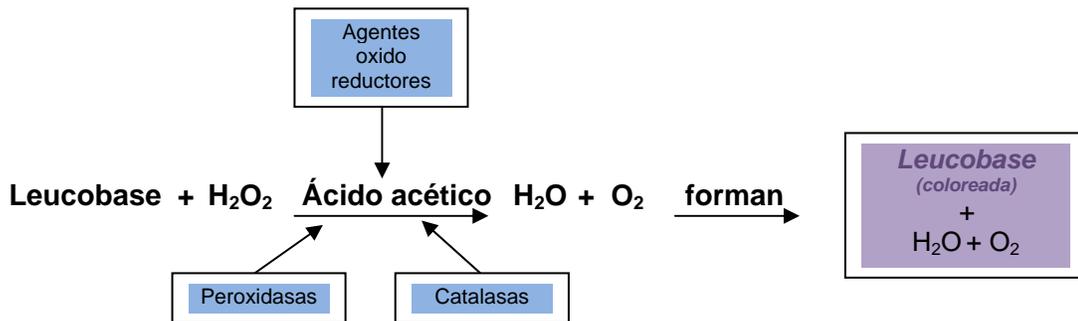
²⁵ XAVIER DOMÉNECH, WILSON F. JARDIM Y MARTA I. LITTER. Potencial Redox de Agentes Oxidantes. 2004. <http://www.miliarium.com/prontuario/Tablas/Quimica/PotencialRedox.htm>

²⁶ **Prácticas de Bioquímica y Biología Molecular.** Practica 8. Propiedades generales y propiedades de las enzimas: Estudio de la peroxidasa. <http://www.um.es/bmbi/Docencia/Practicas/Medicina/PracticasLaboratorio/Practica08.htm>.

adhesivos, antioxidantes, protectores de radiación magnética, colorantes para alimentos y componentes bioactivos de detergentes²⁷.

2.5 Catalasas

La catalasa es una enzima hemínica que se encuentra en la mayoría de los microorganismos aerobios, se encuentra en las células de los tejidos animales, vegetales y también en microorganismos. Su función es descomponer una molécula tóxica, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) resultante del metabolismo celular, en agua y oxígeno. La existencia de catalasa en los tejidos animales, se aprovecha para utilizar el agua oxigenada como desinfectante cuando se aplica sobre una herida. Como muchas de las bacterias patógenas son anaerobias (no pueden vivir con oxígeno), mueren con el desprendimiento de oxígeno que se produce cuando la catalasa de los tejidos actúa sobre el agua oxigenada. La catalasa se manifiesta al igual que la actividad de la peroxidasa, por la oxidación de sustratos acoplados a la reducción de peróxido de hidrógeno, para formar agua y oxígeno molecular²⁸.



²⁷ ARTBIOCHEM. Peroxidasa, <http://www.artbiochem.com/recursos/akpcespanol.pdf>

²⁸ Enzimas. Reconocimientos de la catalasas. <http://abcal.iespana.es/recursos/catalasas>

2.5 Reacciones de oxido reducción

Las reacciones de óxido – reducción o REDOX son aquellas donde está involucrado un cambio en el número de electrones asociado a un átomo determinado, cuando este átomo o el compuesto del cual forma parte se transforma desde un estado inicial a otro final²⁹. La oxidación se refiere a la reacción donde un átomo o un grupo de átomos pierden (e^-) electrones, la reducción se refiere a la reacción donde un átomo o un grupo de átomos ganan (e^-) electrones, y el agente oxidante es la sustancia que se reduce (gana e^- electrones) provocando la oxidación³⁰.

Las reacciones REDOX, tienen las siguientes cualidades:

- Son un proceso químico en el cual cambia el número de oxidación de los elementos.
- El proceso puede incluir la transferencia completa de electrones para formar uniones iónicas o sólo la transferencia parcial o desplazamiento de electrones para formar uniones covalentes.
- Se efectúa una oxidación cuando aumenta el número de oxidación como resultado de la pérdida de electrones.
- Se efectúa una reducción siempre que el número de oxidación disminuya como resultado de una ganancia de electrones³¹

2.7 Pruebas preliminares para la investigación de sangre de interés forense:

Las pruebas preliminares son pasos previos en la analítica, para el estudio de ADN con el fin de individualizar las evidencias, que permiten discriminar el

²⁹ MUÑOZ LOZANO LUISA. Apuntes básicos para la electroquímica. Reacciones de oxido reducción. 2004. <http://www.med.uchile.reaccionesdeoxidoreduccion.pdf>

³⁰ Salas Carmona Carlos. Química y ciencias. 2001. <http://www.quimicayciencias.cjb.net>

³¹. Ídem No 30.

tipo de resto biológico ante el que se encuentran. Son más sencillas que el propio análisis del ADN presente en una muestra, no por ello son menos importantes³².

Las pruebas preliminares para el estudio de sangre se dividen en:

2.7.1 Pruebas de Orientación: Son procedimientos técnicos y científicos que aplicado a la evidencia física, material o testigos y relacionada a los hechos, proporcionan una guía y orientación sobre el objeto de la investigación, es decir, no individualiza sino que nos dice que está encaminado hacia una dirección.³³

Son pruebas que nos revelan la posible naturaleza de la mancha pero no nos la aseguran, sirven sólo para descartar, pero no para concluir. Son sencillas de realizar, de bajo costo, muy rápidas y nos ayudan a seleccionar las manchas a analizar.

Se basan en la capacidad potencial que posee el grupo “Hem” de la hemoglobina para ejercer la actividad peroxidasa, aportando al sistema reaccionante, peróxido de hidrógeno, induciendo el desprendimiento del oxígeno por descomposición del peróxido, el cual actúa sobre un sustrato orgánico reducido (***Bencidina, Fenolftaleína, Verde de Leucomalaquita, Luminol, Thevenon Roland-Piramidón etc.***) transformándolo en su forma oxidada cromática.

³² PRIETO SOLLA LOURDES. APLICACIONES FORENSES DEL ADN. Comisaría General de Policía Científica Laboratorio de ADN. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/aplicaciones_forenses_del_adn.pdf

³³ CONTRERAS JOSÉ DANIEL. Investigación Criminal 2007. <http://www.scribd.com>

Dentro de estas pruebas de orientación encontramos:

- **La Fenolftaleína:** Es un ácido débil que pierde cationes en solución. La molécula de fenolftaleína es incolora, en cambio el anión derivado es de color rosa. Cuando se agrega una base, la fenolftaleína pierde cationes formándose la Fenolftaleína y haciendo que tome coloración rosa. Siendo la fenolftaleína un indicador de pH que en soluciones ácidas permanece incoloro, pero en presencia de bases se torna rosa o violeta: utiliza el reactivo conocido con el nombre de Kastle-Meyer. Si al aplicar unas gotas del reactivo, aparece color rosa-violeta, presuntamente es sangre. Si continúa incoloro, es negativo absoluto.
- **El Reactivo de Adler:** Utiliza la solución de **Bencidina** en medio acético ó etílico. En presencia de sangre da una tonalidad azul verdoso, por formación del azul de la bencidina. El uso de este reactivo está casi totalmente descartado debido a sus características cancerígenas.
- **El Luminol:** Es un derivado del ácido ftálico (3-aminonaftilhidracina), es un sólido verdoso poco soluble. Su mayor importancia reside en la reacción de quimo-luminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizadores. Es una prueba muy popular usada para la visualización de manchas tan diluidas que son invisibles al ojo desnudo. Esta pericia es altamente sensible a la presencia de manchas que han sido limpiadas. También se emplea para visualizar huellas sanguinolentas de zapatos dejadas en la escena del delito. Este popular producto puede ser preparado en laboratorio ó bien adquirido en su preparación comercial. La primera posibilidad presenta la dificultad de ser difícil de preparar y estabilizar, por lo que normalmente se adquiere comercialmente. En cualquiera de los casos, el Luminol se

aplica por aspersion sobre la zona donde se cree puede existir un rastro de sangre, de donde viene su principal ventaja: se puede aplicar en extensas superficies, detectando sangre hasta a nivel de trazas³⁴.

- Reacción de **Thevenon-Roland o del Piramidon**: Es una disolución etanólica de piramidon, esta se macera en ácido acético concentrado, se añade el reactivo y unas gotas de agua oxigenada, siendo positiva es de color violeta³⁵.

2.7.2 Pruebas de Certeza: Son procedimientos técnicos científicos que aplican tecnología y ciencia; arrojando como resultado que el objetivo de la investigación es ese y no otro. Este proceso de investigación da como resultado la seguridad en un resultado, identificando plenamente el objetivo al cual se le aplica el método³⁶.

Estas pruebas nos permiten determinar el tipo de resto biológico analizado con seguridad, para determinar si la sangre es humana o animal. La detección de hemoglobina en la muestra para determinación de sangre o la visualización al microscopio de espermatozoides para la determinación de semen son algunos ejemplos.

³⁴ Introducción a la criminalística. México. 2009. <http://www.criminalística.net>

³⁵ CONTRERAS JOSÉ DANIEL. Investigación Criminal 2007. <http://www.scribd.com>

³⁶ ídem 33

Se puede clasificar en 4 pruebas:

- **Pruebas Histológicas:** Se basa en poner de manifiesto las células sanguíneas a través del microscopio óptico.
- **Pruebas Cristalográficas o Microquímicas:** Pretende obtener sustancias derivadas de la hemoglobina, que forman unos cristales característicos visibles con el microscopio óptico. Son técnicas sencillas.

Dentro de estas pruebas podemos encontrar:

- **Cristales de Hematina:** Son formas de cristales clorhidrato de hematina también llamados Teichman, son muy característicos por sus formas de prismas rómbicos, alargados y de color pardo oscuro. Se obtiene mayor número si se utiliza el reactivo de Gabriel Bertrand. Los cristales de yodhidrato de hematina son prismas rómbicos de color muy oscuro que se obtiene con el reactivo de strzyzowski.
- **Cristales de Hemocromógeno:** Normalmente suele emplearse la solución de Takayama, es una solución acuosa de glucosa a la que se añade piridina. Se obtienen cristales delgados, en formas de agujas de color amarillo-naranja. Técnica más empleadas son las basadas en la obtención de cristales de Teichman, reactivos más estables.
- **Pruebas Espectroscópicas:** Se busca obtener el espectro de absorción de la hemoglobina y de sus derivados. Las técnicas espectroscópicas no son tan empleadas.

- **Pruebas Cromatográficas:** Técnicas utilizadas para separar sustancias. Para la sangre se suele utilizar la cromatografía en capa fina (TLC), o la cromatografía sobre papel. La posición de cada sustancia es característica de la misma y para ello se emplea el índice de retención, es el cociente entre dividir distancia que ha recorrido el eluyente desde la primera aplicación entre la distancia que ha alcanzado las muestras.

2.7.3 Pruebas Específicas: Estas pruebas nos permiten determinar el tipo de organismo al que pertenece el resto biológico. Una vez que se ha determinado el tipo de muestra analizado se trata de determinar si la muestra es humana o no. Se emplean pruebas inmunológicas y se pueden dividir en:

- **Pruebas “in vivo”:** son pruebas que se realizan en seres vivos, ejemplo: se inyecta sangre humana a un conejo a los veinte días se inyecta un macerado de la mancha problema, si es humana el animal experimentara un shock anafiláctico, no se usa esta técnica.
- **Pruebas “in Vitro”:** son pruebas realizadas en tubos de ensayo o en ambientes controlados por fuera del organismo. Se emplean los anticuerpos que el animal ha generado tras inyectarle suero humano, se separa el suero con los anticuerpos y se purifica obteniendo así un anticuerpo humano.
- **Técnica de la Difusión Doble y Radial de Ouchterlony:** Consiste en formar un gel de agarosa. Si las proteínas de los tres pocillos han difundido radialmente y se han juntados las

líneas (se unen y fusionan) es sangre humana, si las líneas se reúnen pero forman un espolón, se trata de una reacción de semidentidad, si las líneas se cruzan no es humana.

- **Inmunoelectroforesis:** Es una herramienta de trabajo fundamental en la Criminalística, consiste en aplicar la muestra que se va estudiar en un soporte inerte que se asienta sobre una placa de vidrio y se ponen dos electros entre los extremos y se aplican un campo eléctrico.

2.7.4 Pruebas de Individualización: Se utilizan técnicas de biología molecular para la amplificación del ADN mediante la PCR u otras pruebas moleculares. Demostrando que la sangre es humana y a qué individuo pertenece.

Estas pruebas identifican plenamente un objetivo o a una persona; es aportar los elementos que separan un individuo de otro y/o un objeto de otro³⁷.

Para estos estudios de individualización básicamente se emplea la molécula de **ADN**, (es un ácido nucleico que contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria), se localiza dentro de las células que forman los diferentes tejidos de un individuo y para poder analizarla, previamente hay que aislarla

³⁷ CONTRERAS JOSÉ DANIEL. Investigación Criminal 2007. <http://www.scribd.com>

separándola del resto de componentes celulares. El análisis del ADN se realiza en cuatro fases:

- **Extracción de ADN:** consiste en separar la molécula de ADN del resto de componentes celulares. Es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de la molécula. Existen gran cantidad de sustancias que pueden interferir en este proceso, bien de los propios reactivos utilizados durante la extracción o bien de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas. La duración y rendimiento de este proceso también depende en gran medida del tipo de resto biológico que se está analizando
- **Cuantificación de ADN:** una vez que se ha finalizado la extracción se realiza la cuantificación para saber qué cantidad de ADN se ha logrado aislar y en qué estado se encuentra (completo o roto).
- **Amplificación de ADN:** consiste en copiar muchas veces el fragmento concreto de ADN que se quiere estudiar para obtener una cantidad adecuada que permita su detección. Este proceso se denomina PCR (polymerase chain reaction) y gracias a él se puede analizar pequeñas cantidades de muestra biológica. Normalmente se amplifican varios fragmentos de ADN en paralelo para evitar agotar la muestra y para conseguir una mayor rapidez en el análisis (multiplex PCR).
- **Detección del Producto Amplificado:** esta es la fase final del análisis molecular y es la que permite caracterizar y clasificar

los fragmentos de ADN estudiados en cada muestra para diferenciar unas de otras³⁸.

2.8 Pruebas de orientación para la detección de manchas de sangre

Dentro de estas podemos encontrar las pruebas coloreadas y quimioluminiscentes para la detección de manchas de sangre, estas se basan en la utilización de productos químicos que cambian de color cuando entran en contacto con la sangre.

2.8.1 Pruebas Coloreadas

Son métodos que utilizan diferentes reacciones mediadas por enzimas que finalizan en la formación de complejos coloreados que se pueden evidenciar por la aparición de color.

Las reacciones que intervienen en las técnicas coloreadas, están mediadas por la acción de las peroxidasas, catalasas y/o agentes oxido reductores; que son capaces de descomponer el peróxido de hidrogeno en agua mas oxigeno, este oxida la leucobase y esta cambia de color, dependiendo de la base empleada. Dentro de estas pruebas se encuentra el Thevenon Roland-Piramidón usando como leucobase la aminofenazona³⁹.

³⁸ **PRIETO SOLLA LOURDES**. APLICACIONES FORENSES DEL ADN. Comisaría General de Policía Científica Laboratorio de ADN.

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/aplicaciones_forenses_del_adn.pdf

³⁹ **SALCEDO CIFUENTES MERCEDES**, Manejo de la Evidencia Física de posible fuente Biológica, Colección Ciencias Físicas, Exactas y Naturales, programa editorial Universidad del Valle, Páginas. 52 a 55.

2.8.1.1 Técnica Thevenon Roland-Piramidón

La técnica de Thevenon-Roland se aplica en elementos motivo de estudio impregnados al parecer de sangre en manchas secas, prendas de vestir, diferentes armas, algodón, papel, hojas, costras, escamas, muestras líquidas, para identificación de manchas de sangre, para análisis subsiguientes.

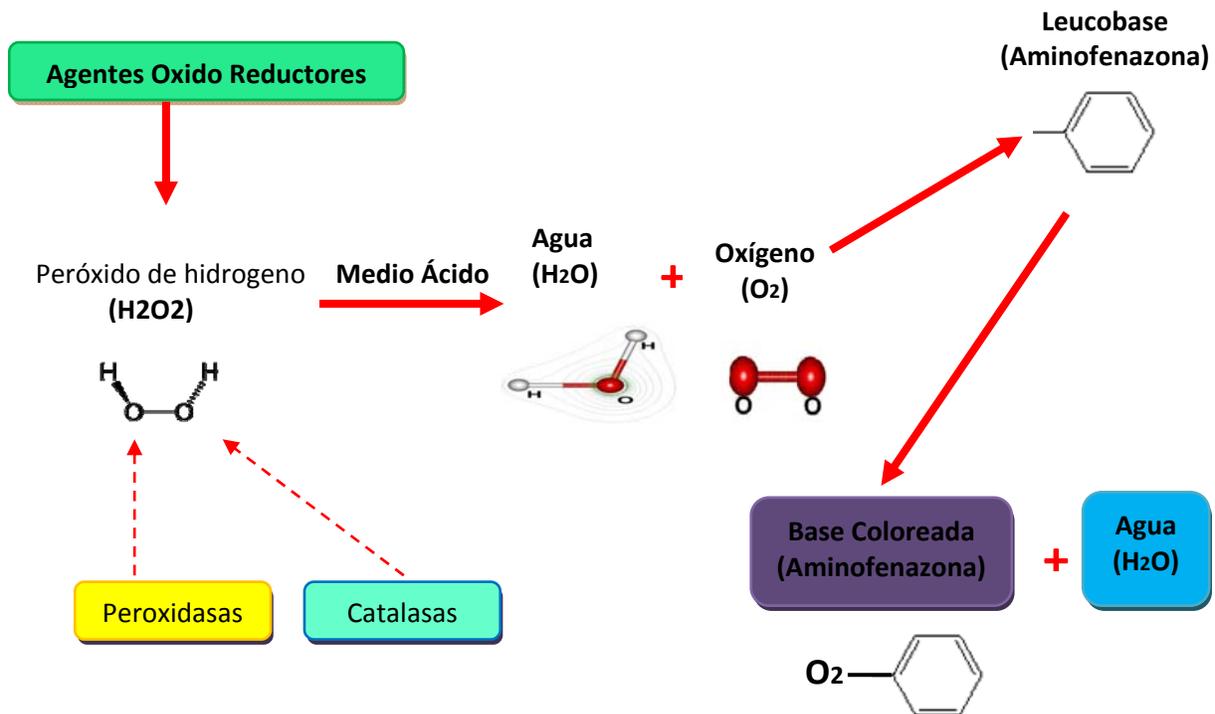
Esta técnica se lleva a cabo por las reacciones de oxidación-reducción, que se basan en la detección de peroxidasas, catalasas y/o agentes oxidoreductores (*el hierro presente en el grupo HEM de la hemoglobina*), estos tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno, en agua más oxígeno, este oxida la leucobase (*aminofenazona*) y esta cambia de color, (de incoloro a lila, violeta o morado). El ácido acético da estabilidad a la reacción y en algunos casos rompe los lisosomas liberando las peroxidasas y catalasas de cualquier tipo de célula⁴⁰.

La aminofenazona (*sustrato*), se oxida por acción del hierro presente en el grupo Hem de la hemoglobina, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua más oxígeno, y este oxígeno se adhiere a la aminofenazona coloreándola por algunos segundos. Adicionalmente, el medio ácido es requerido para garantizar la máxima estabilidad de los productos formados en la reacción (*pH de 4-5 aproximadamente*), contribuyendo con el tiempo de desarrollo del color del sustrato⁴¹. El cambio de color del sustrato utilizado en estas técnicas se debe al paso de su forma oxidada de la leucobase a la forma reducida, base coloreada, debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno.

⁴⁰ PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE TRABAJO PARA DETECCIÓN DE SANGRE MEDIANTE PRUEBA PRESUNTIVA DE THEVENON-ROLAND. Código:DRC-GBF-T-PET-01 (MERCK Y ALDRICH).

⁴¹ PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE TRABAJO PARA DETECCIÓN DE SANGRE MEDIANTE PRUEBA PRESUNTIVA DE THEVENON-ROLAND. Código:DRC-GBF-T-PET-01

⁴² GUTIÉRREZ, R. CARMONA A. Validación de los métodos de Thevenon-Roland y Verde de Leucomalaquita como pruebas presuntivas en la investigación de sangre en manchas y fluidos. IBF. Pereira 2004.



El cambio de color del sustrato utilizado en esta técnica se debe al paso de la forma oxidada de la leucobase a su forma reducida, base coloreada, debido a la descomposición del peróxido de hidrogeno⁴².

2.8.2 Pruebas Quimioluminiscentes

En estas pruebas se genera una reacción química, con el fin de deshacerse del exceso de energía liberando fotones en forma de luz fría. Al poner en contacto la mezcla química con agentes oxido reductores, peroxidasas y/o catalasas en medio fuertemente alcalino, hacen que se liberen oxígenos y estos desplacen nitrógenos de la base empleada para la reacción, liberándolos; estos son muy inestables y forman fotones que se puede observar en la oscuridad mediante la emisión de luz azul fría.

Dentro de estas pruebas se encuentra el Bluestar Forensic, encontrando en el mercado diferentes clases de este. Estos nuevos productos cuyo objetivo es revelar manchas de sangre que se han eliminado, borrado, o que son invisibles a simple vista, están destinados para uso forense. Actúan sobre la base de la quimioluminiscencia, su fórmula única lo califica como el medio más eficaz revelador de sangre, disponible actualmente para la escena del crimen. Se pueden encontrar en el mercado, las siguientes presentaciones⁴³:

2.8.2.1 Bluestar Forensic Magnum



El Bluestar Forensic Magnum, es un reactivo tres veces más potente que el Bluestar Forensic normal. Ha sido especialmente formulado para los casos críticos cuando diminutas partículas de sangre son buscadas. Esas gotas, invisibles a simple vista, e inclusive bajo una lupa, son algunas veces la única evidencia para confinar a un sospechoso. El Magnum es también muy útil cuando se buscan manchas de sangre en prendas de ropa (u otros objetos). Su alta sensibilidad hace que las manchas de sangre se manifiesten fácilmente. Particularmente apropiado para técnicos de laboratorios forenses que necesitan un químico extremadamente eficiente para un examen detallado de artículos tales como ropa o armas. También

⁴³ Bluestar Forensic. El mejor revelador de manchas de Sangre oculta en la escena del crimen. Madrid, España. www.bluestar-forensic.com

es utilizable en una gran variedad de situaciones, en el laboratorio o en la escena de crimen, que involucre un área de búsqueda limitada. Contiene una botella de reactivo de 125 ml de solución quimioluminiscente y (3) tres pastillas del oxidante. Tiene una vida útil de (8) ocho horas a partir del momento de su preparación, porque tiene un pH altamente alcalino, que degrada el ADN con el tiempo, impidiendo así, utilizar las muestras para análisis posteriores de individualización⁴⁴.

2.8.2.2 Bluestar Forensic Destroyer



El Bluestar Forensic Destroyer es utilizado en el entrenamiento forense de técnicos en la escena del crimen⁴⁵ y sirve únicamente para este propósito, debido a su alta alcalinidad no es recomendable utilizarlo en escenas reales. Tiene el mismo empaque y la misma cantidad de pastillas que el Bluestar Forensic normal, pero es más económico para poder reducir los costos de entrenamiento. Reacciona de la misma forma que el Bluestar Forensic normal, exceptuando que ésta versión destruye el ADN por tener un pH superior a 11.5, esta compuesto por (4) cuatro pares de pastillas, cada par

⁴⁴ Ídem 44.

⁴⁵ Inserto, Casa comercial Bluestar forensic. Destroyer DNA

contiene una pastilla de color beige (reactivo) y una pastilla de color blanca (catalizador), en 125 ml de agua destilada⁴⁶.

2.8.2.3 Bluestar Forensic Free

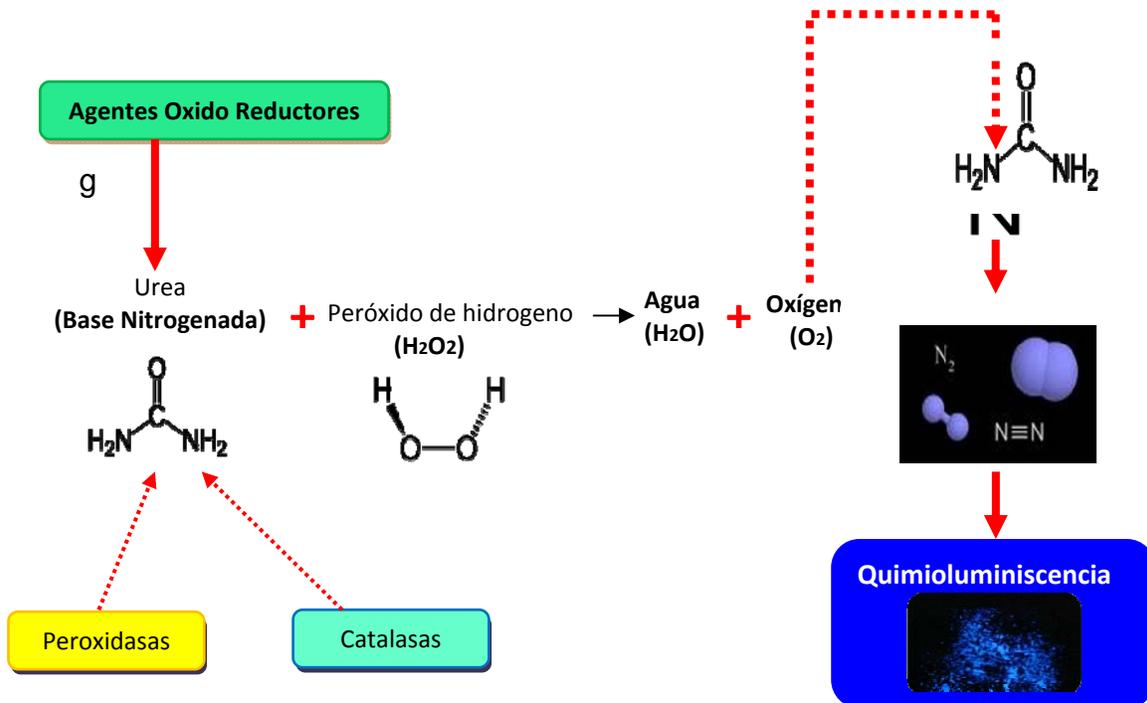


El Bluestar Forensic Free es un reactivo muy sensible para la detección de mínimas cantidades de sangre en diferentes soportes. Este nuevo producto está particularmente adaptado para buscar en objetos y en pequeñas áreas la presencia de sangre, para una investigación preliminar en la escena del crimen o en las situaciones que requieran menos producto revelador; a la vez se puede trabajar tanto en manchas de sangre fresca, como en manchas viejas, alteradas, diluidas o puras. Tiene un pH de 11.5 que no destruye el ADN, permitiendo así, análisis posteriores. Es fácil y seguro de preparar, puede ser rociado muchas veces sobre las mismas manchas de sangre con el mismo resultado de quimioluminiscencia. No es toxico, gracias a la ausencia del perborato de sodio y es fácilmente reciclable. Cada kit contiene (8) ocho pastillas beige (reactivo) y (8) ocho pastillas blancas (catalizador)⁴⁷.

46. Ídem 44.

47. **BLUESTAR**. Ciencia Forense.cl Revista On-Line de Criminalística. 2009. www.cienciaforense.com.

La reacción de quimioluminiscencia ocurre cuando la Urea (*base nitrogenada*) mas una sustancia fuertemente alcalina (*peróxido de hidrogeno*) en presencia de agentes oxido reductores (*hierro de la sangre*), peroxidasa y/o catalasas, hacen que libere oxígeno del álcali mas agua y estos desplacen nitrógenos de la urea, liberándolos, por ser estos muy inestables (N_2) forman fotones que se puede observar en la oscuridad mediante la emisión de luz azul brillante. Cuando no existe agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas en esta reacción, no se observa la emisión de luz azul brillante. En otras palabras, una mezcla de Bluestar Forensic Free + un agente oxidante + un medio alcalino en contacto con los agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas emiten luz azul brillante. En otras palabras, una mezcla de Bluestar Forensic Free + un agente oxidante + un medio alcalino en contacto con los agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas emiten luz azul brillante⁴⁸.



48. Ídem No 47

2.9 Validación de Técnicas Analíticas

Los laboratorios de análisis, ofrecen como producto los resultados obtenidos luego de aplicar un método experimental sobre una muestra sometida a estudio. Los Laboratorios Forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses son una estructura típica de “laboratorio de análisis” que, a diferencia de los otros, no emite conceptos diagnósticos de tipo clínico sino que proporciona resultados que serán utilizados para ayudar al esclarecimiento de hechos motivo de investigación judicial⁴⁹.

De acuerdo al nuevo código de procedimiento penal, resulta de vital importancia el testimonio de los peritos en las audiencias y la validez de los análisis de acuerdo a la experiencia del perito y el nivel de confiabilidad de los métodos analíticos utilizados en la pericia, hecho por el cual dichas pruebas o métodos de análisis de aplicación forense deben ser sometidas a procedimientos de validación una vez diseñadas, con el fin de conocer y garantizar sus atributos de calidad y su confiabilidad, para luego ser llevadas a procedimientos estandarizados de trabajo (PET) y ser así ejecutadas en los diferentes laboratorios forenses del país.

Se entiende por validación al conjunto de procedimientos experimentales sistemáticos, coordinados y documentados, cuyo objetivo es establecer los parámetros y características operacionales de un método analítico forense determinado y demostrar que el método es válido. La necesidad de establecer programas y protocolos de validación metodológica y calidad científica sobre las diferentes técnicas de análisis que se aplican en el ámbito forense puede, por un lado, verse reflejada en la cantidad de dictámenes periciales que los Laboratorios Forenses de todo el país emiten anualmente

49. **MANRIQUE HERNANDEZ RUBEN**. Manuel de referencia para la validación de técnicas analíticas. INMLyCF. 1995. Página 7.

como producto de su labor. De otro lado, la dimensión de ésta necesidad es también producto de la responsabilidad que la sociedad y el estado le han entregado al Instituto, al encargarle la misión de “prestar auxilio, soporte técnico y científico a la Administración de Justicia en todo el territorio nacional, en lo concerniente a medicina legal y ciencias forenses”.

Para cumplir total y adecuadamente con ésta responsabilidad, se debe, en primer lugar, comprender y asimilar como se ha hecho, el significado social, ético y científico que tiene la realización de cada prueba pericial por compleja o sencilla que ella sea; luego se debe desarrollar un sistema que asegure permanentemente la alta calidad de cada uno de éstos análisis y mantenga vigente el respaldo científico alrededor de ellos. La validez de un método analítico puede ser verificada solamente mediante estudios de laboratorio. Por consiguiente, es un requerimiento básico la documentación sobre el éxito completo de tales estudios para determinar si un método es apropiado para las aplicaciones esperadas. Esto quiere decir que todo programa de validación debe ejecutarse manteniendo un registro continuo de cada uno de los procedimientos realizados y de sus resultados, con el fin de poder evaluar realmente cuáles fueron los logros obtenidos y tener una herramienta documental que sirva de base para posteriores revisiones del método validado⁵⁰.

El método estadístico se convierte en herramienta indispensable para cualquier programa de validación. De aquí se definen los diferentes parámetros que deben considerarse como atributos, una vez establecidos permitirán definir el grado de confiabilidad de una prueba analítica forense. Existe gran variedad de conceptos sobre lo que son los diferentes atributos

50. **MANRIQUE HERNANDEZ RUBEN**. Manual de referencia para la validación de técnicas analíticas. INMLyCF. 1995. Página 7.

operacionales de un proceso de análisis. Cada área del conocimiento cuya función es generar resultados como producto de una serie de mediciones o valoraciones diagnósticas, califica sus indicadores de una forma específica, ajustada al lenguaje particular que ella utiliza. Entre estos conceptos de fundamentación epidemiológica están: Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), Índice de Kappa, Índice de Concordancia, Sensibilidad, Especificidad, Límite de Detección, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo, que permitan evaluar con mayor rigor científico los métodos analíticos que se aplican en los laboratorios forenses.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema

¿Cuáles son los atributos analíticos del *Bluestar Forensic Free* y del *Thevenon Roland-Piramidón*, como pruebas preliminares en la investigación de sangre en manchas y soluciones, para su aplicación en la marcha analítica forense?

3.2 Justificación de la investigación

En la actualidad el sistema de investigación tradicional ha venido perfeccionando e incluyendo el análisis de diversos residuos biológicos, entre ellos se encuentran: semen, saliva, sangre, uñas, piel, cabellos. Pero la sangre sigue siendo el recurso más importante y el más fácil de analizar, en donde en muy corto tiempo se obtienen resultados favorables en la investigación. Son varios los procedimientos utilizados para la detección de manchas de sangre debido a que es un campo muy amplio, pero es fundamental en el desarrollo de cualquier investigación que se implementen nuevas técnicas, donde el elemento materia de prueba es de gran utilidad.

Es por esto, que en búsqueda del esclarecimiento de los hechos delictivos se hace necesaria la validación de la técnica *Bluestar Forensic Free* y *Thevenon Roland-Piramidón* en el Laboratorio de Biología Forense del INMLyCF, técnicas actualmente utilizadas por algunos Laboratorios Forenses a nivel mundial.

La violencia social ha traído consigo una serie de modificaciones en las conductas delictivas, que se han hecho relativamente frecuentes al determinar los tipos de actos criminales, implementando el uso de la fuerza

entre la víctima y el agresor, o por la utilización de instrumentos y armas que hacen que las evidencias o indicios dejados en el lugar de los hechos sean mínimos. Su utilidad en casos de violación, homicidio y otros crímenes proporciona una huella visible, pero en la no visibilidad de sangre en la escena del crimen no se excluye que se haya cometido un delito. La distribución, tamaño y forma de las manchas de sangre sobre la víctima, el sospechoso o la escena del crimen pueden ser útiles en la interpretación y reconstrucción de los eventos que causaron el patrón de manchas o trazas de sangre halladas. La sangre es una huella esencial para posteriores análisis y cotejo de ADN.

Las técnicas de Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón permiten orientar al investigador y al perito como abordar el caso de acuerdo a la cantidad de muestra y al sustrato o soporte en el que llegan al laboratorio.

Establecer su origen aporta información útil para el proceso posterior de inclusión o exclusión de sospechosos o víctimas, ya que una vez que se compruebe que se trata de sangre se sigue en la identificación de su origen diciendo si es humana o animal, y de esta manera continuar con la prueba de ADN.

La técnica Thevenon Roland-Piramidón se aplica en elementos motivo de estudio impregnados al parecer de sangre en manchas secas (prendas de vestir, diferentes armas, algodón, papel, hojas, costras, escamas, polvo, muestras líquidas), con el fin de identificar si la muestra es sangre presuntamente, dado que de este resultado se desprende los análisis subsiguientes.

El Bluestar Forensic Free es de gran importancia para el campo forense ya que ayuda a la ubicación de manchas que han sido lavadas, pintadas o limpiadas y que no son perceptibles al ojo humano, permitiendo su visualización por la intensa luz azul brillante que se presenta en la reacción, fortaleciendo la identificación de muestras para análisis posteriores.

Estas son pruebas de orientación y ubicación, de naturaleza química y coloreadas, rápidas, de fácil manejo y que han sido utilizadas por otros laboratorios forense. Ambas, según la referencia bibliográfica son, técnicas muy sensibles, medianamente específicas y económicas.

Se logró obtener con este estudio una validez y confiabilidad de las técnicas de Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón, y sus posibles interferencias en el estudio durante el muestreo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Validar las técnicas Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense, LBIF-INMLyCF, Bogotá 2009.

4.2 Objetivos Específicos

- Conocer la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, límite de detección, índice kappa, índice de concordancia, reproducibilidad y repetibilidad de las técnicas de Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón.
- Determinar si el uso de los diferentes sustratos o soportes pueden presentar interferencias con estas dos técnicas.
- Determinar la capacidad del Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón para detectar sangre en manchas que han sido lavadas, limpiadas o pintadas y que han sido sometidas a diferentes condiciones para modificar su naturaleza.
- Evaluar el desempeño de las dos técnicas para la detección de sangre al contacto con sustancias que pueden inhibir su reacción.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación y población de estudio

TIPO DE INVESTIGACIÓN	Tipo Experimental, cualitativo y prospectivo
UNIVERSO	Manchas de sangre, puras, diluidas y mezcladas, extractos de productos vegetales, productos químicos y fluidos biológicos de origen humano.
MUESTRAS	<ul style="list-style-type: none">• Sangre humana: 6 muestras.• Sangre animal: 4 muestras.• Productos vegetales: 19 muestras.• Productos químicos: 32 muestras.• Fluidos corporales: 4 muestras.• Entremezclas de sangre con productos químicos y fluidos biológicos humanos: 35 <p>Para un total de 100 muestras en diferentes soportes o sustratos.</p>
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	Muestras que tuviesen agentes oxido reductores, Peroxidasas y/o Catalasas o sustancias con tonalidades de rojo.
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	Muestras que NO tuviesen agentes oxido reductores, Peroxidasas y/o Catalasas, ni tonalidades de rojo excepto los controles negativos.
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	Se determinaron atributos como la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice kappa, índice de concordancia, repetibilidad y reproducibilidad.

5.2 Estudio a ciegas

En este estudio, se tomaron muestras ya elaboradas, donde un analista asignó un código numérico a cada muestra aleatoriamente y lo consignó en un listado. Estas muestras codificadas pasaron a una persona ajena al estudio, quien lo codificó por segunda vez. Esta doble codificación fue guardada hasta finalizar todos los análisis, solo hasta entonces se descubrió y comparó, los listados de las muestras codificadas.

A1: analista 1: Rosa Lilia Gutiérrez Jara. Profesional Especializado Forense, en el Laboratorio de Biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

A2: analista 2: Luisa Fernanda Arbeláez Murillo o Linda Sorieth Ríos Herrera. Estudiantes de la carrera de Bacteriología de décimo semestre, con un año de experiencia en el Hospital San Rafael de Caqueza-Cundinamarca y en el Laboratorio de Biología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

5.3 Criterios para la selección de muestras y de sustratos

Una muestra de sangre humana conocida, fue utilizada como control positivo y agua destilada como control negativo, estas muestras fueron puestas sobre tela de tipo poliéster viscoso de color azul claro, para la validación de las técnicas.



La sangre humana conocida, también fue seleccionada para hacer las diluciones correspondientes, ser mezcladas con sustancias y comprobar hasta qué punto estas sustancias interferían o inhibían la reacción.

Los fluidos seleccionados se utilizaron, puesto que podían reaccionar con las técnicas, ya que en estos se pueden encontrar peroxidasas y catalasas, que son las que van a permitir que tenga lugar la reacción, infiriendo errores en las lecturas.

Los productos vegetales se seleccionaron según su coloración semejante a la de la sangre y a la de algunos fluidos corporales, coloraciones como: amarillo, beige, pardo amarillo, pardo café y pardo rojizas; además porque en estos productos también se encuentran peroxidasas y catalasas.

Los productos químicos fueron escogidos por su coloración semejante a la de la sangre y por ser algunos compuestos oxido reductores que pudieran reaccionar con algunos reactivos y dar falsos positivos.

5.4 Selección y tratamiento de los sustratos o soportes:

Se emplearon 17 clases de sustratos o soportes, como: Poliéster (azul, rojo, gris, blanco, negro, rosado, café, morado), algodón (amarillo, blanco, azul, verde, vino tinto, rosado y gris), lino (verde, blanco, rosado, rojo, estampado y fucsia), lycra (fucsia y rosada), toalla (estampado), jeans (azul), cuerina (naranja, mostaza y café), cuero (gris), papel (blanco, filtro, periódico, kraft), vidrio (transparente, Botella de color ámbar), mechas de trapero, espuma, tabletas de baldosa (café y blanca), malla (blanca), trozo de madera y tornillo. Los diferentes sustratos de telas nuevas, se cortaron en trozos de (5 x 5 cm) cinco por cinco centímetros cada uno, con equipo de disección esterilizado por (20) veinte minutos en cabina de flujo laminar.

- Cada fragmento se colocó a hervir en solución jabonosa aproximadamente por (2) dos horas. Pasadas las (2) dos horas, se dejó enfriar y se descartó la sustancia jabonosa. Se repitió este procedimiento una vez más.
- Se lavaron con agua caliente (4) cuatro veces y se dejaron escurrir.
- Cada fragmento de tela se colocó en recipiente plástico y se esterilizó por (20) veinte minutos con luz ultra violeta en cabina de flujo laminar. Se empacó cada una en bolsas de papel, y a su vez en bolsas plásticas transparentes.

Los diferentes papeles nuevos utilizados como sustratos, fueron sometidos al mismo tratamiento excepto por las lavadas.

Los vidrios, las tabletas de baldosa, las botellas de vidrio, las mechas de trapero, las espumas, las mallas y los trozos de madera, se lavaron con agua jabonosa caliente (2) dos veces y se limpiaron con agua caliente (4) cuatro veces. Se llevaron a esterilizar por (20) veinte minutos con luz ultra violeta en cabina de flujo laminar.

Los tornillos escogidos para el estudio, estaban oxidados. Se esterilizaron por (20) veinte minutos con luz ultra violeta en cabina de flujo laminar.

5.5 Selección de las muestras:

Uno de los analistas, mujer sana de mente y cuerpo, mayor de 18 años, donó voluntariamente muestra de sangre, que fue tomada por punción venosa con anticoagulante EDTA, con previa información sobre el proyecto y con su respectivo consentimiento informado (ver anexo #1).

Otro de los analistas, mujer sana de mente y cuerpo, mayor de 18 años, donó voluntariamente muestra de materia fecal, orina, saliva y sudor, con previa información sobre el proyecto y con su respectivo consentimiento informado (ver anexo #1).

Las muestras de sangre animal se adquirieron en el comercio, comprando carne fresca de cerdo, vaca, pescado y pollo, se tomaron fragmentos de estas y se depositaron en recipientes estériles con tapa, hasta lograr que el fluido sanguíneo de cada muestra soltara espontáneamente la suficiente cantidad de sangre, con la cual manchamos adecuadamente los respectivos sustratos.



Se obtuvieron los diferentes productos vegetales en el comercio, teniendo en cuenta su estado en general, seleccionando los productos frescos, libres de contaminación por hongos, que no tuvieran cáscaras rotas, magulladuras, fisuras o cualquier estado de descomposición. Se les realizó maceración manual o mecánica, hasta obtener sustancias cremosas que se depositaron sobre los sustratos elegidos.



Para la selección de los productos químicos se tuvieron en cuenta las fechas de vencimiento y que no estuvieran contaminados con otros reactivos. Algunos productos químicos fueron depositados directamente sobre el sustrato y otros fueron colocados sobre manchas de sangre ya realizadas.

TABLA #1: Universo de muestras para análisis

ORIGEN	MUESTRAS	RECOLECCIÓN
SANGRE	<u>HUMANA</u> Manchas Liquidas	La venopunción se realizó en la mañana, con previa desinfección del brazo y medidas de bioseguridad.
	<u>ANIMALES</u> Pollo, Pescado Cerdo, Res.	Se adquirieron en el mercado sangre de estos animales mediante la compra de sus carnes.
FLUIDOS HUMANOS	<u>Sudor</u>	Una persona trotó durante 30 minutos, luego de lo cual se recolectó su sudor en el sustrato identificado.
	<u>Orina</u>	Se recogió la primera micción de la mañana tomando la mitad de ella, en un recipiente de orina nuevo y estéril.
	<u>Materia fecal</u>	Se tomó directamente en recipiente nuevo y estéril.
	<u>Saliva</u>	La persona no ingirió alimentos ni bebidas, no masticó chicle ni fumo dos (2) horas antes de la toma de la muestra y se realizó un adecuado aseo bucal. Se recolectó en recipiente nuevo y estéril.

PRODUCTOS QUÍMICO	Isodine	Se tomaron los productos y se impregnaron en los diferentes sustratos o soportes. Se tomaron los productos y se impregnaron en los diferentes sustratos o soportes.
	Cloruro férrico	
	Vino tinto	
	Tiocianato de potasio	
	Sulfato de zinc	
	Sulfato de hierro	
	Pintura roja	
	Labial rojo	
	Peróxido de hidrogeno	
	Esmalte rojo	
	Perborato de potasio	
	Permanganato de potasio	
	Oxido de tornillo	
	Hipoclorito	
	Detergente	
	Limpia vidrios	
	Amoniaco	
	Marcador rojo	
	Sulfato de magnesio	
	Lugol	
	Alcohol antiséptico	
	Betún líquido	
	Acido acético	
	Lápiz de ojos rojo	
	Rubor rojo	
	Dolex gripa rojo	
	Tornillo oxidado	
	Crema de manos	
	Salsa BBQ	
	Soflan	
Soda caustica		
Noraver garganta rojo		
PRODUCTOS VEGETALES	Plátano verde	Se tomaron los productos y se impregnaron en los diferentes sustratos o soportes.
	Cebolla cabezona	
	Repollo morado	
	Rábano	
	Remolacha	
	Ciruella	
	Zanahoria	
	Tomate de árbol	
	Manzana roja	
	Uva morada	
	Berenjena	
	Mora	
	Rosas rojas	
	Hojas de árbol	
	Pepa de aguacate	
	Diente de león	
	Lenteja	
	Cilantro	

	Fresa	
--	-------	--

TABLA #1: En la tabla se identifican las muestras que fueron utilizadas en el estudio de validación, su selección se realizó en base a la literatura aportada de estudios similares. Se implementaron nuevos recursos para la elaboración de las muestras de acuerdo a la exigencia y aplicación forense. Cada una de las muestras aportadas por los donantes en el estudio contó con su respectivo formato de consentimiento informado, firmado de forma voluntaria, en el cual se notificó el objetivo y algunas generalidades del estudio.

5.6 Preparación de las manchas para muestras con sangre humana, animal, fluidos biológicos, productos químicos y vegetales

- A algunos de los sustratos se les adicionó el producto, en proporción, (40ul) cuarenta microlitros del producto para (0.5 x 0.5 cm) punto cinco por punto cinco centímetros de sustrato.
- Se dejaron secar (3) tres horas, aproximadamente, en cabina de flujo laminar, hasta alcanzar la completa sequedad de las manchas.
- Se guardaron en bolsas de papel, marcada y posteriormente en bolsa plástica.

5.7 Preparación de las sustancias inhibidoras

Algunas muestras de sangres, fueron mezcladas con sustancias que posiblemente podían inhibir la reacción de color. Parte de estas fueron sometidas a diferentes temperaturas superiores a (30°C) treinta grados centígrados, otras a procesos de lavado, algunas más se les adicionaron productos químicos y las últimas fueron expuestas a luz ultra violeta por determinado tiempo, a continuación se describen la preparación de estas:

- Mancha de sangre + (1g) un gramo de detergente en polvo.
- Mancha de sangre + (1g) un gramo de hidróxido de sodio sólido al 10%.
- Mancha de sangre + (1ml) un mililitro de jugo de limón.

- Mancha de sangre + (1ml) un mililitro de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Mancha de sangre + (1ml) un mililitro de hipoclorito de sodio al 5%.
- Mancha de sangre *expuesta* a 30°C por (2) dos horas.
- Mancha de sangre *expuesta* a luz ultravioleta por (2) dos horas.
- Mancha de sangre *expuesta* a 60°C por (2) dos horas.
- Mancha de sangre, en tableta blanca de 37x37cm aproximadamente *expuesta* a luz ultravioleta por (2) dos horas.
- Mancha de sangre en tableta beige de 18x18cm aproximadamente *expuesta* a luz ultravioleta por (2) dos horas.
- Mancha de sangre en tableta beige, pintada, de 18x18cm aproximadamente *expuesta* a luz ultravioleta por (2) dos horas.
- Mancha de sangre lavada 10 veces con agua de chorro *expuesta* a luz ultra violeta por (2) dos horas.

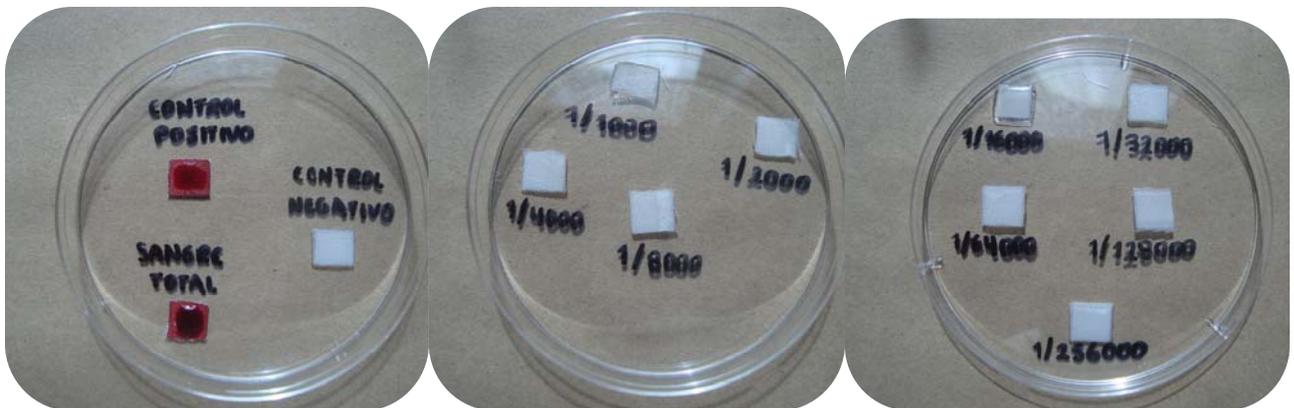
5.8 Preparación de las diluciones

Se realizaron las respectivas diluciones en forma líquida y de mancha. Las muestras de los extractos y diluciones se almacenaron en tubos de ensayo a 4°C para su posterior análisis.

Se realizaron diluciones, 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/8.000, 1/16.000, 1/32.000, 1/64.000, 1/128.000 y 1/256.000, en tubos de vidrio de 13 x 100 con agua destilada.



Para las diluciones en mancha se tomaron fragmentos de tela estéril (dacrón blanco), con medidas de (1 x 1cm) un centímetro por un centímetro. Se colocaron en cajas de Petri marcadas según cada dilución, luego se depositaron (160 ul) ciento sesenta microlitros, en proporción, de cada dilución sobre los sustratos. Se dejaron secar en cabina de flujo laminar aproximadamente por (3) tres horas, hasta alcanzar la completa sequedad de las manchas para su análisis.



5.8.1 Mancha de sangre pura: Se tomó un fragmento de sustrato de (0.5 x 0.5cm) punto cinco por punto cinco y se le adicionaron (40 ul) cuarenta microlitros de sangre, en proporción.

5.8.2 Diluciones de las manchas de sangre: Se hicieron diluciones de sangre líquida más agua destilada en tubos de ensayo, de la siguiente manera, con el fin de realizar los análisis para Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón en sangre diluida.

Tabla #2. Diluciones de sangre

No del Tubo	Diluciones de sangre	Volumen de la dilución (ml)	Más	Volumen de agua destilada adicionada (ml)
2	1: 1.000	0.1 ml de sangre concentrada	+	99.9ml
3	1: 2.000	50ml de dilución 1:1.000	+	50ml
4	1: 4.000	50ml de dilución 1:2.000	+	50ml
5	1: 8.000	50ml de dilución 1:4.000	+	50ml
6	1: 16.000	50ml de dilución 1:8.000	+	50ml
7	1: 32.000	50ml de dilución 1:16.000	+	50ml
8	1: 64.000	50ml de dilución 1:32.000	+	50ml
9	1: 128.000	50ml de dilución 1:64.000	+	50ml
10	1: 256.000	50ml de dilución 1:128.000	+	50ml

Tabla #2: De las diluciones se elaboraron también manchas de sangre para mirar el comportamiento del Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón para sangre en mancha diluida.

5.9 Muestreo y codificación de las muestras

Los analistas prepararon los extractos o juegos de cada muestra por cuadruplicado, se rotularon con un número de orden correspondiente a cada uno de los juegos que se registraron en un formato especial. Luego de terminar la preparación de las muestras y su rotulación, se entregaron a una persona ajena a este trabajo, quien asignó un código numérico aleatorio a cada juego de muestras tomadas, este código fue registrado en un formato que se mantuvo oculto para los analistas, hasta finalizar el trabajo de campo, para que el estudio se realizara **a ciegas** y evitar el posible sesgo de los analistas si conociesen la identidad de las muestras que analizaba.

Tabla #3. Codificación de las muestras para el estudio

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo
4	11	Rábano	Algodón color blanco
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco
6	20	Ciruela	Licra color fucsia
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco
8	3	Tomate de árbol	Poliéster viscoso color gris
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto
10	5	Uva morada	Algodón color blanco
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado
18	13	Isodine	Algodón color blanco
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja
24	18	Orina	Jean color azul
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza
27	22	Sangre humana	Cuero color gris, con pintura roja
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia
29	44	Labial rojo	Lino color blanco
30	30	Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	Poliéster viscoso color negro
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco
32	99	Perborato de potasio	Dacrón color blanco
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia
45	96	Sangre humana	Papel blanco

46	32	Sangre humana	Papel filtro
47	90	Sangre humana	Papel periódico
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar
50	36	Sangre humana	Mechas de trapero
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox., lavada con agua de chorro.
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox.
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox., limpiada con limpia vidrios
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox., pintada con vinilo blanco
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 aprox.
65	47	Sangre humana	Malla color blanca
66	45	Diente de león	Lino color blanco
67	50	Lenteja	Lino color fucsia
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro
75	91	Sangre humana	Papel kraft
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco
78	53	Salsa BBQ	Algodón color blanco
79	54	Cilantro	Algodón color blanco
80	56	Soflan	Algodón color blanco
81	60	Sangre humana	Seda color negra
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco
83	61	Sangre humana	Dacrón color blanco
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia
86	62	Soda cáustica	Poliéster color blanco
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco
88	93	Ácido acético	Algodón color vino tinto
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h

94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H ₂ O ₂
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada, con luz U.V/ 2h
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h

Tabla #3: Se fabricaron (3) tres juegos de manchas donde cada sustrato o soporte tenía mancha por cuadruplicado. Se realizó un juego de manchas para cada analista y otro para reserva en caso de requerir confirmar análisis.

5.10 Equipos

- Cámara fotográfica: SONY, cyber – shot, Zoom óptimo 4x, 7.2 Mega Pixels, retrato crepúsculo, alta sensibilidad.
- Cámara de extracción de gases.
- Nevera de 2°C a 8 °C.
- Vortéx.
- Termohigrómetro calibrado y verificado.
- Cabina de flujo laminar.
- Balanza analítica.
- Cronómetro.
- Pipetas volumétricas.

5.11 Materiales

- Tijeras pequeñas de punta fina.
- Bisturí.
- Telas.
- Espátulas.
- Bolsas de papel de diferentes tamaños.
- Puntas para pipetas automáticas.
- Bolsas plásticas de diferentes tamaños.
- Marcadores permanentes.
- Guantes, batas desechables, tapabocas,
- Frascos color ámbar con tapa.
- Probetas graduadas.
- Pipetas Pasteur.
- Gradillas para tubos.
- Tubos de ensayo.
- Recipientes plásticos con tapa.
- Cinta de enmascarar.
- Recipientes de vidrio.
- Papel kraft.

gorros.

- Atomizador.
- Frascos recolectores de coprológico.
- Frascos recolectores de orina.
- Agua destilada.

5.12 Reactivos

5.12.1 Thevenon Roland-Piramidón:

- Aminofenazona ($C_{13}H_{17}N_3O$). *Grado analítico al 100% de pureza. Marca Merck.*
- Etanol (Alcohol etílico). *Grado analítico al 99.9% de pureza. Marca Merck.*
- Ácido acético. *Grado analítico al 100% de pureza. Marca Merck.*
- Peróxido de hidrógeno. *Grado analítico al 30% de pureza. Marca J.T. Baker.*
- Agua destilada.
- Solución de trabajo # 1: Piramidón.
- Solución de trabajo # 2: Ácido acético al 1/3.
- Solución de trabajo # 3: Peróxido de Hidrógeno al 3%.

5.12.2 Bluestar Forensic Free:

- Una pastilla de color blanca que contiene urea (Catalizador).
- Una pastilla de color beige que contiene peróxido de hidrógeno (Reactivo).
- Agua destilada 125 ml.

5.13 Preparación de reactivos

5.13.1 Thevenon Roland-Piramidón

5.13.1.1 Alcohol etílico al 90%

Se preparó (100 ml) cien mililitros de alcohol al 90%, partiendo de uno al 99.9% de pureza en agua destilada, utilizando la siguiente fórmula para hacer la conversión:

V1 = Volumen uno

C1 = Concentración uno

V2 = Volumen dos

C2 = Concentración dos

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 100 \text{ ml} \times 90\% &= V_2 \times 99.9\% \\ 90.090 \text{ ml de etanol al } 99.9\% &= V_2 \end{aligned}$$

Etanol (C ₂ H ₅ OH) al 99.9%	—————>	90.090 ml
H ₂ O destilada	—————>	9.91 ml
Total	—————>	100 ml

En un matraz aforado de (100 ml) cien mililitros se midió el volumen de agua y el volumen de etanol al 99.9%, se mezcló por inversión y se almacenó en frasco de vidrio ámbar. Se guardó a 5°C +/- 3°C. Esta solución se utilizó para la preparación del reactivo #1.

5.13.1.2 Solución de trabajo # 1 Piramidón

Se preparó (100 ml) cien mililitros de la solución anterior, se utilizó la Aminofenazona (C₁₃H₁₇N₃O) de Merck al 100% de pureza, en solución alcohólica al 90%.

Aminofenazona (C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O) al 100%	—————>	1.33 g
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH) al 90%	—————>	100 ml

Se mezcló hasta alcanzar la dilución completa del soluto. Se envasó en frasco de vidrio color ámbar y se rotuló. Se guardó 5°C +/- 3°C.

5.13.1.3 Solución de trabajo # 2 Ácido Acético Glacial al 1/3

Se preparó (150 ml) ciento cincuenta mililitros de ácido acético al 1/3, partiendo del Acido Acético glacial al 100% de Merck en agua destilada.

Acido Acético glacial (CH ₃ COOH)	—————>	50 ml
H ₂ O destilada	—————>	100 ml

Se midió el volumen calculado de cada reactivo en una probeta. Se adicionó el acido acético sobre el agua destilada. Se mezcló por inversión, se rotuló y guardó en refrigeración a 5°C +/- 3°C.

5.13.1.4 Solución de trabajo # 3 Peróxido de Hidrógeno al 3%

Se preparó (100 ml) cien mililitros de esta solución, partiendo del Peróxido de Hidrógeno al 30% Merck, en agua destilada. Como se necesitó Peróxido al 3%, se utilizó la siguiente fórmula.

$$\begin{array}{rcl}
 V_1 \times C_1 & = & V_2 \times C_2 \\
 100 \text{ ml} \times 3\% & = & V_2 \times 30\% \\
 10 \text{ ml de H}_2\text{O}_2 \text{ al } 30\% & = & V_2
 \end{array}$$

Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) 30%	—————>	10 ml
H ₂ O destilada	—————>	90 ml
Total	—————>	100ml

En un matraz aforado de (100 ml) cien mililitros se adicionó el volumen de agua hasta que se completó el volumen del Peróxido de Hidrógeno, se

envasó en frasco de vidrio color ámbar debidamente rotulado. Se guardó en refrigeración a 5°C +/- 3°C.



5.13.2 Bluestar Forensic Free

Del kit de Bluestar Forensic Free se tomó un par de pastillas para la preparación de la solución. Realizando el siguiente procedimiento:

1. En una probeta se midió (125 ml) ciento veinticinco mililitros de agua destilada y se agregó al atomizador junto con el par de pastillas (blanca + beige).
2. Se mezcló hasta diluir completamente la solución.
3. Esta solución de trabajo es estable hasta por (8) ocho horas, por ello se utilizó y se preparó el mismo día, utilizándola durante las (3) tres primeras horas para evitar aumento del pH.



5.14 Procedimiento

Se tomaron todas las medidas de bioseguridad por el personal que manipuló las muestras y los soportes, para cada técnica.

5.14.1 Thevenon Roland-Piramidón

Para cada montaje se utilizaron placas de toque o láminas excavadas de porcelana, se incluyeron controles positivos y negativos por cada placa, cada 10 muestras. Para el control positivo se tomó sangre humana en mancha y para el control negativo agua destilada.

Se cortaron trozos de algodón estériles de (1 x 1cm) un centímetro por un centímetro aproximadamente, estos se colocaron en los pozos de las placas de toque, debidamente marcados. Para identificar a cada analista, se utilizaron marcadores de color rojo y verde, siendo el color rojo para el analista 1 y el color verde para el analista 2. Para cada placa se colocaron las muestras con sus respectivos controles sobre los algodones estériles.



1. Se colocaron trozos de (0.5 x 0.5cm) punto cinco por punto cinco centímetros, aproximadamente, de cada uno de las muestras y se dispensaron (30uL) treinta microlitros de cada dilución y de los controles en cada pozo.



2. Sobre cada muestra a analizar y cada uno de los controles, se dispensa las soluciones de trabajo de la siguiente manera:

30 μ L de la solución de trabajo # 1 (Piramidón)

+

30 μ L de la solución de trabajo # 2 (Acido acético al 1/3)

+

30 μ L de la solución de trabajo # 3 (Peróxido de hidrogeno al 3%)

3. Inmediatamente se agregó el último reactivo, se accionó el cronómetro.
4. Se hizo lectura e interpretación de los resultados desde inmediatamente y hasta (1) un minuto.

5.14.2 Bluestar Forensic Free

El montaje se realizó en cuarto oscuro, analizando grupos de 10 muestras para evitar contaminación entre ellas, de la siguiente manera:

1. Se colocó cada mancha codificada sobre fragmento de papel kraft.



2. Se aplicó el Bluestar Forensic Free sobre los controles y se verificó su efectividad para detectar manchas de sangre latentes. Se utilizó el atomizador directamente sobre la muestra a analizar.
3. Se observó la emisión de luz azul brillante desde inmediatamente y hasta (2) dos minutos después de agregado el reactivo y se realizó la lectura de cada muestra.

5.14.2.1 Procedimiento de fotografía:

1. Se configuró la cámara perpendicular a la superficie de las muestras y se invalidó el uso del flash automático.
2. Se roció la solución de Bluestar Forensic Free sobre cada una de las muestras varias veces para **reactivar** la quimioluminiscencia y obtener un buen registro fotográfico.
3. Se enfocó el lente de la cámara manualmente sobre la luz azul brillante que emitía la muestra.
4. Se contó con un tiempo de exposición de aproximadamente (30) treinta segundos para tomar la foto. Se disparó varias veces la cámara para obtener imágenes a diferentes velocidades.

5.15 Lectura e interpretación de resultados

5.15.1 Thevenon Roland-Piramidón

Positivo: Cambio de color de incoloro a lila, violeta o morado hasta (1) un minuto después agregar el último reactivo.
Trazas: leve cambio de color de incoloro a lila, violeta o morado hasta (1) minuto después de agregar el último reactivo.
Inconcluyente: Cambio de color con la adición del primer o segundo reactivo.
Negativo: Incoloro o no desarrollo de color hasta (1) minuto después de agregar el ultimo reactivo.

De acuerdo a la intensidad del color, se designó por cruces cada reacción, interpretándose como una cruz (1+) la mínima intensidad de color y con (4+) cuatro cruces la máxima intensidad de color sobre las muestras analizadas.

5.15.2 Bluestar Forensic Free

Positivo: La emisión de luz azul brillante en la oscuridad, inmediatamente y hasta dos (2) minutos después de agregar el reactivo.
Negativo: Ausencia de luz azul brillante en la oscuridad, hasta dos (2) minutos después de agregar el reactivo.
Inconcluyente: La emisión de luz azul brillante sin haber agregado el reactivo.
Trazas: La aparición de puntos azules brillantes que desaparecen inmediatamente.

De acuerdo a la intensidad y tamaño de la luz emitida, se designó por cruces cada reacción, interpretándose como (1+) una cruz la mínima emisión de luz y de menor tamaño, y con (4+) cuatro cruces la máxima emisión de luz y de mayor tamaño sobre las muestras analizadas.

6. RESULTADOS

Tabla #4. Resultados de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	Thevenon Roland Piramidón		Bluestar Forensic Free	
				A1	A2	A1	A2
ANALISTAS							
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	POS	POS	POS	POS
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo	NEG	NEG	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
4	11	Rábano	Algodón color blanco	NEG	NEG	POS	POS
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco	POS	POS	NEG	NEG
6	20	Ciruela	Licra color fucsia	NEG	NEG	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	Poliéster viscoso color gris	NEG	NEG	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto	NEG	NEG	NEG	NEG
10	5	Uva morada	Algodón color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde	NEG	NEG	NEG	NEG
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro	POS	POS	NEG	NEG
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	POS	POS	POS	POS
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado	POS	POS	POS	POS
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo	POS	POS	POS	POS
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores	POS	POS	POS	POS
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado	POS	POS	POS	POS
18	13	Isodine	Algodón color blanco	POS	POS	POS	POS
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco	POS	POS	POS	POS
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado	NEG	NEG	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco	POS	POS	POS	POS
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG	POS	POS
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja	POS	POS	POS	POS
24	18	Orina	Jean color azul	NEG	NEG	NEG	NEG
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café	NEG	NEG	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza	POS	POS	POS	POS
27	22	Sangre humana	Cuero color gris, con pintura roja	POS	POS	POS	POS
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia	NEG	NEG	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	Lino color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	Dacrón color blanco	NEG	NEG	POS	POS

**Continuación tabla #4. Resultados de Thevenon Roland-Piramidón y
Bluestar Forensic Free**

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	Thevenon Roland Piramidón		Bluestar Forensic Free		
				A1	A2	A1	A2	
			ANALISTAS					
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	POS	POS	POS	POS	
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG	
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto	NEG	NEG	POS	POS	
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo	NEG	NEG	NEG	NEG	
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco	NEG	NEG	POS	POS	
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo	POS	POS	POS	POS	
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado	NEG	NEG	NEG	NEG	
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto	NEG	NEG	POS	POS	
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG	NEG	NEG	
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG	NEG	NEG	
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG	NEG	NEG	
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG	NEG	NEG	
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG	NEG	NEG	
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG	NEG	NEG	
45	96	Sangre humana	Papel blanco	POS	POS	POS	POS	
46	32	Sangre humana	Papel filtro	POS	POS	POS	POS	
47	90	Sangre humana	Papel periódico	POS	POS	POS	POS	
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente	POS	POS	POS	POS	
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar	POS	POS	POS	POS	
50	36	Sangre humana	Mechas de trapero	POS	POS	POS	POS	
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla	POS	POS	POS	POS	
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor	POS	POS	POS	POS	
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina	POS	POS	POS	POS	
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva	POS	POS	POS	POS	
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal	POS	POS	POS	POS	
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro	POS	POS	POS	POS	
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro	POS	POS	POS	POS	
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG	
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro.	POS	POS	POS	POS	
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox.	POS	POS	POS	POS	
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.	POS	POS	POS	POS	

**Continuación tabla #4. Resultados de Thevenon Roland-Piramidón y
Bluestar Forensic Free**

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	Thevenon Roland Piramidón		Bluestar Forensic Free	
				A1	A2	A1	A2
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	POS	POS	POS	POS
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios	POS	POS	POS	POS
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada con vinilo blanco	POS	POS	POS	POS
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 aprox.	POS	POS	POS	POS
65	47	Sangre humana	Malla color blanca	POS	POS	POS	POS
66	45	Diente de león	Lino color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
67	50	Lenteja	Lino color fucsia	NEG	NEG	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	Papel kraft	POS	POS	POS	POS
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado	NEG	NEG	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
78	53	Salsa BBQ	Algodón color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
79	54	Cilantro	Algodón color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
80	56	Soflan	Algodón color blanco	NEG	NEG	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	Seda color negra	POS	POS	POS	POS
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco	POS	POS	POS	POS
83	61	Sangre humana	Dacron color blanco	POS	POS	POS	POS
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca	POS	POS	POS	POS
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia	POS	POS	POS	POS
86	62	Soda cáustica	Poliéster color blanco	NEG	NEG	POS	POS
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco	POS	POS	POS	POS
88	93	Ácido acético	Algodón color vino tinto	NEG	NEG	POS	POS
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida	NEG	NEG	POS	POS
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente	POS	POS	POS	POS
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón	POS	POS	POS	POS
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h	POS	POS	POS	POS
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h	POS	POS	POS	POS
94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H2O2	POS	POS	POS	POS
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito	POS	POS	POS	POS
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h	POS	POS	POS	POS

**Continuación tabla #4. Resultados de Thevenon Roland-Piramidón y
Bluestar Forensic Free**

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	Thevenon Roland Piramidón		Bluestar Forensic Free	
				A1	A2	A1	A2
ANALISTAS							
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	POS	POS	POS	POS
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG	NEG	NEG
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h	POS	POS	POS	POS
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h	POS	POS	POS	POS
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada, con luz U.V/ 2h	POS	POS	POS	POS
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h	POS	POS	POS	POS

Tabla #4: En esta tabla se comparan los resultados encontrados por el analista #1 y #2 para los diferentes especímenes (sangre humana, sangre animal, fluidos corporales humanos, productos vegetales y químicos) en diversos sustratos.

Tabla # 4.1: Lectura e Interpretación de resultados para Thevenon Roland-Piramidón:

POS	POSITIVO (Cambio de color de incoloro a lila, violeta o morado hasta (1) un minuto después de agregar el último reactivo).
NEG	NEGATIVO (Incoloro o no desarrollo de color hasta (1) un minuto después de agregar el último reactivo).
INC	INCONCLUYENTE (Cambio de color con la adición del primer o segundo)
TRAZAS	Leve cambio de color de incoloro a lila violeta o morado hasta (1) minuto después de agregar el último reactivo.

Tabla # 4.2: Lectura e Interpretación de resultados para Bluestar Forensic Free:

POS	POSITIVO (Emisión de luz azul brillante en la oscuridad, inmediatamente y hasta dos (2) minuto después de agregar el reactivo).
NEG	NEGATIVO (Ausencia de luz azul brillante en la oscuridad, inmediatamente y hasta dos (2) minuto después de agregar el reactivo)
INC	INCONCLUYENTE (Emisión de luz azul brillante sin haber agregado el reactivo)
TRAZAS	Aparición de puntos azules brillantes que desaparecen inmediatamente

Tabla #5. Agrupación de los resultados obtenidos según la tabla de 2 x 2 para datos estadísticos.

PRUEBAS PRELIMINARES	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (b)	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)
Thevenon Roland-Piramidón	44/100	8/100	1/100	47/100
Bluestar Forensic Free	45/100	14/100	0/100	41/100

Tabla #5: Se tomó como **verdaderos positivos** las muestras que tenían sangre y cuya lectura fue positiva, **falsos negativo** muestras que tenían sangre y cuya lectura fue negativa, como **verdaderos negativos** muestras que no tenían sangre y cuya lectura fue negativas y **falsos positivos** muestras que no tenían sangre y cuya lectura fue positivos.

6.1 Repetibilidad

Se quiere ilustrar con este atributo cualitativo la precisión del método cuando este se aplicó sobre la misma muestra en condiciones semejantes (equipo, reactivo, operador, condiciones ambientales) pero solo se vario en las horas del montaje.

6.1.1 Resultados de la repetibilidad para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón:

Tabla # 6: Repetibilidad para el Analista #1 / DÍA #1.

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:00 a 12:00	HORA 15:00 a 19:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo	NEG	NEG
4	11	Rábano	Algodón color blanco	NEG	NEG
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco	1+	1+
6	20	Ciruela	Licra color fucsia	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	Poliéster viscoso color gris	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
10	5	Uva morada	Algodón color blanco	NEG	NEG

Continuación Tabla # 6: Repetibilidad para el Analista #1 / DÍA #1.

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:00 a 12:00	HORA 15:00 a 19:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro	2+	2+
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado	3+	3+
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo	4+	4+
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores	4+	4+
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado	4+	4+
18	13	Isodine	Algodón color blanco	3+	3+
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco	2+	2+
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco	1+	1+
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja	2+	2+
24	18	Orina	Jean color azul	NEG	NEG
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza	4+	4+
27	22	Sangre humana	Cuero color gris, con pintura roja	4+	4+
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	Lino color blanco	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	Dacron color blanco	NEG	NEG
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco	NEG	NEG
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo	3+	3+
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	Toalla estampada (colores)	NEG	NEG

Continuación Tabla # 6: Repetibilidad para el Analista #1 / DÍA #1.

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:00 a 12:00	HORA 15:00 a 19:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	Papel blanco	4+	4+
46	32	Sangre humana	Papel filtro	4+	4+
47	90	Sangre humana	Papel periódico	4+	4+
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente	4+	4+
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar	4+	4+
50	36	Sangre humana	Mechas de traperero	4+	4+

Tabla # 7 Repetibilidad para el Analista # 1/ DÍA #2.

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 9:00 a 12:00	HORA 14:00 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla	4+	4+
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor	4+	4+
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina	4+	4+
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva	4+	4+
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal	3+	3+
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro	3+	3+
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro	2+	2+
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro.	4+	4+
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox.	4+	4+
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.	4+	4+
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios	3+	3+
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada con vinilo blanco	3+	3+

Continuación Tabla # 7 Repetibilidad para el Analista # 1/ DÍA #2

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 9:00 a 12:00	HORA 14:00 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 cm aprox.	4+	4+
65	47	Sangre humana	Malla color blanca	3+	3+
66	45	Diente de león	Lino color blanco	NEG	NEG
67	50	Lenteja	Lino color fucsia	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	Papel kraft	4+	4+
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	Algodón color blanco	NEG	NEG
79	54	Cilantro	Algodón color blanco	NEG	NEG
80	56	Soflan	Algodón color blanco	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	Seda color negra	4+	4+
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco	3+	3+
83	61	Sangre humana	Dacron color blanco	2+	2+
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca	4+	4+
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia	4+	4+
86	62	Soda caustica	Poliéster color blanco	NEG	NEG
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco	4+	4+
88	93	Acido acético	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida	NEG	NEG
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente	4+	4+
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón	4+	4+
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h	4+	4+
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h	4+	4+
94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H2O2	4+	4+
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito	4+	4+
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h	4+	4+
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h	4+	4+

Continuación Tabla # 7 Repetibilidad para el Analista # 1/ DÍA #2

ORDEN	Código Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 9:00 a 12:00	HORA 14:00 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h	4+	4+
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox, pintada con luz U.V/ 2h	3+	3+
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h	2+	2+

Tabla # 8 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 7:10 a 11:45	HORA 14:00 a 18:20
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo	NEG	NEG
4	11	Rábano	Algodón color blanco	NEG	NEG
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco	2+	2+
6	20	Ciruela	Licra color fucsia	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco	NEG	NEG
8	3	Tomata de árbol	Poliéster viscoso color gris	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
10	5	Uva morada	Algodón color blanco	NEG	NEG
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro	3+	2+
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado	3+	2+
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo	3+	3+
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores	4+	3+
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado	3+	3+
18	13	Isodine	Algodón color blanco	3+	3+
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco	2+	2+

Continuación Tabla # 8 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 7:10 a 11:45	HORA 14:00 a 18:20
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco	1+	1+
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja	2+	2+
24	18	Orina	Jean color azul	NEG	NEG
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza	4+	4+
27	22	Sangre humana con pintura roja	Cuero color gris	3+	3+
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	Lino color blanco	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	Dacrón color blanco	NEG	NEG
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco	NEG	NEG
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo	2+	2+
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG

Continuación Tabla # 8 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 7:10 a 11:45	HORA 14:00 a 18:20
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	Papel blanco	3+	3+
46	32	Sangre humana	Papel filtro	3+	3+
47	90	Sangre humana	Papel periódico	3+	3+
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente	4+	4+
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar	4+	4+
50	36	Sangre humana	Mechas de traperero	3+	2+

Tabla # 9 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:10 a 12:00	HORA 14:05 a 18:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla	4+	4+
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor.	4+	3+
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina	4+	4+
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva	4+	4+
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal	3+	3+
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro	3+	3+
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro	3+	2+
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro.	4+	4+
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox.	4+	4+
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.	4+	4+
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios	3+	3+
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada con vinilo blanco	3+	3+

Continuación Tabla # 9 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #2

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:10 a 12:00	HORA 14:05 a 18:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 aprox.	4+	3+
65	47	Sangre humana	Malla color blanca	2+	2+
66	45	Diente de león	Lino color blanco	NEG	NEG
67	50	Lenteja	Lino color fucsia	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	Papel kraft	3+	3+
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	Algodón color blanco	NEG	NEG
79	54	Cilantro	Algodón color blanco	NEG	NEG
80	56	Soflan	Algodón color blanco	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	Seda color negra	4+	4+
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco	2+	2+
83	61	Sangre humana	Dacron color blanco	1+	1+
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca	3+	3+
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia	2+	POS
86	62	Soda caustica	Poliéster color blanco	NEG	NEG
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco	POS	POS
88	93	Acido acético	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida	NEG	NEG
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente	3+	3+
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón	4+	4+
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h	4+	4+
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h	3+	3+
94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H2O2	4+	4+
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito	4+	4+
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h	4+	4+
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h	4+	4+

Continuación Tabla # 9 Repetibilidad para el Analista # 2/ DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
				HORA 8:10 a 12:00	HORA 14:05 a 18:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h	4+	4+
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada, con luz U.V/ 2h	3+	3+
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h	2+	2+

6.1.2 Resultados de la repetibilidad para Técnica de Bluestar Forensic Free.

Tabla # 10 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #1

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:30 a 12:30	HORA 14:30 a 18:30
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo	NEG	NEG
4	11	Rábano	Algodón color blanco	2+	2+
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
6	20	Ciruela	Licra color fucsia	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	Poliéster viscoso color gris	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
10	5	Uva morada	Algodón color blanco	NEG	NEG
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro	NEG	NEG

Continuación Tabla # 10 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #1

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:30 a 12:30	HORA 14:30 a 18:30
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado	3+	3+
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo	4+	4+
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores	4+	4+
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado	4+	4+
18	13	Isodine	Algodón color blanco	3+	3+
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco	1+	1+
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco	1+	1+
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores	1+	1+
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja	3+	3+
24	18	Orina	Jean color azul	NEG	NEG
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza	4+	4+
27	22	Sangre humana	Cuero color gris, con pintura roja.	4+	4+
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	Lino color blanco	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	Dacron color blanco	1+	1+
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto	1+	1+
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco	4+	4+
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo	3+	3+
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto	1+	1+
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG

Continuación Tabla # 10 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #1

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:30 a 12:30	HORA 14:30 a 18:30
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	Papel blanco	4+	4+
46	32	Sangre humana	Papel filtro	4+	4+
47	90	Sangre humana	Papel periódico	4+	4+
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente	4+	4+
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar	4+	4+
50	36	Sangre humana	Mechas de trapero	4+	4+

Tabla # 11 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:40 a 11:56	HORA 13:29 a 18:05
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla	4+	4+
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor	4+	4+
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina	4+	4+
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva	4+	4+
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal	4+	4+
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro	3+	3+
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro	2+	2+
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro.	4+	4+
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox.	4+	4+
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.	4+	4+

Continuación Tabla # 11 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:40 a 11:56	HORA 13:29 a 18:05
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios	3+	3+
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada con vinilo blanco	4+	4+
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 aprox.	4+	4+
65	47	Sangre humana	Malla color blanca	4+	4+
66	45	Diente de león	Lino color blanco	NEG	NEG
67	50	Lenteja	Lino color fucsia	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	Papel kraft	4+	4+
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	Algodón color blanco	NEG	NEG
79	54	Cilantro	Algodón color blanco	NEG	NEG
80	56	Soflan	Algodón color blanco	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	Seda color negra	4+	4+
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco	4+	4+
83	61	Sangre humana	Dacron color blanco	4+	4+
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca	4+	4+
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia	4+	3+
86	62	Soda caustica	Poliéster color blanco	4+	4+
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco	4+	4+
88	93	Acido acético	Algodón color vino tinto	2+	2+
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida	3+	3+
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente	4+	4+
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón	4+	4+
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h	4+	4+
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h	4+	4+
94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H2O2	4+	4+
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito	4+	4+

Continuación Tabla # 11 Repetibilidad para el Analista # 1 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:40 a 11:56	HORA 13:29 a 18:05
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h	4+	4+
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h	4+	4+
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h	4+	4+
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada, con luz U.V/ 2h	4+	4+
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h	4+	4+

Tabla # 12 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				7:20 a 11:30	13:00 a 16:15
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	Algodón color amarillo	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	Poliéster color rojo	NEG	NEG
4	11	Rábano	Algodón color blanco	2+	2+
5	15	Remolacha	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
6	20	Ciruela	Licra color fucsia	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	Algodón estampado color azul y blanco	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	Poliéster viscoso color gris	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	Algodón color vino tinto	NEG	NEG
10	5	Uva morada	Algodón color blanco	NEG	NEG
11	1	Berenjena	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
12	4	Mora	Poliéster estampado color blanco y negro	NEG	NEG
13	10	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	Algodón estampado color rosado	3+	3+

Continuación Tabla # 12 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				7:20 a 11:30	13:00 a 16:15
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
15	12	Sangre de cerdo	Algodón estampado color azul y amarillo	3+	3+
16	21	Sangre de res	Toalla estampada con múltiples colores	4+	4+
17	76	Sangre de pollo	Lino estampado color rosado	3+	3+
18	13	Isodine	Algodón color blanco	3+	2+
19	16	Cloruro férrico	Lino estampado color rojo y blanco	1+	1+
20	26	Vino tinto	Poliéster viscoso color rosado	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	Dacrón color blanco	2+	2+
22	37	Sulfato de Zinc	Toalla estampada con múltiples colores	1+	1+
23	40	Sulfato de hierro	Cuerina color naranja	3+	3+
24	18	Orina	Jean color azul	NEG	NEG
25	29	Saliva	Poliéster estampado color café	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	Cuerina color mostaza	4+	4+
27	22	Sangre humana	Cuero color gris, con pintura roja.	3+	3+
28	23	Pintura roja	Lino color fucsia	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	Lino color blanco	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	Poliéster viscoso estampado de color morado y blanco	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	Dacron color blanco	1+	1+
33	24	Permanganato de potasio	Algodón color vino tinto	2+	2+
34	25	Oxido de tornillos	Algodón color amarillo	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	Lino estampado en color rojo y blanco	3+	3+
36	74	Detergente	Algodón estampado en color azul y amarillo	3+	3+
37	77	Limpia vidrios	Algodón estampado en color rosado	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	Algodón color vino tinto	1+	1+
39	35	Marcador rojo	Algodón estampado color verde	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	Lino estampado color verde y blanco	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	Toalla estampada con múltiples colores	NEG	NEG
42	82	Sudor	Algodón estampado de color azul y blanco	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	Lino estampado de color rojo y blanco	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	Licra color fucsia	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	Papel blanco	4+	4+
46	32	Sangre humana	Papel filtro	4+	4+

Continuación Tabla # 12 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #1.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				7:20 a 11:30	13:00 a 16:15
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
47	90	Sangre humana	Papel periódico	4+	4+
48	97	Sangre humana	Vidrio transparente	4+	4+
49	33	Sangre humana	Botella de vidrio color ámbar	4+	4+
50	36	Sangre humana	Mechas de trapero	4+	4+

Tabla # 13 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:00 a 12:00	HORA 14:15 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
51	34	Sangre humana	Espuma color amarilla	4+	4+
52	41	Sangre humana	Poliéster color blanco, más sudor	4+	4+
53	69	Sangre humana	Poliéster estampado de color blanco y negro, más orina	4+	4+
54	42	Sangre humana	Poliéster color blanco, más saliva	4+	4+
55	55	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, más materia fecal	4+	4+
56	43	Sangre humana	Licra color rosada, lavada hasta 10 veces con agua de chorro	3+	3+
57	68	Lugol	Poliéster color azul claro	3+	3+
58	95	Pepa aguacate	Lino color blanco	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro.	4+	4+
60	87	Sangre humana	Tableta color beige, 18x18 cm aprox.	4+	4+
61	98	Sangre humana	Tableta color café, de 29x29 cm aprox.	4+	4+
62	100	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios	3+	3+
63	46	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada con vinilo blanco	4+	4+
64	39	Sangre humana	Trozo de madera, color café, de 40x40 aprox.	4+	4+
65	47	Sangre humana	Malla color blanca	4+	4+
66	45	Diente de león	Lino color blanco	NEG	NEG

Continuación Tabla # 13 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:00 a 12:00	HORA 14:15 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
67	50	Lenteja	Lino color fucsia	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
70	83	Fresa	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	Poliéster viscoso color negro	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	Poliéster color azul claro	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	Papel kraft	3+	3+
76	52	Tornillo oxidado	Tornillo oxidado	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	Algodón color blanco	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	Algodón color blanco	NEG	NEG
79	54	Cilantro	Algodón color blanco	NEG	NEG
80	56	Soflan	Algodón color blanco	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	Seda color negra	4+	4+
82	57	Sangre humana	Franela estampada color azul y blanco	3+	3+
83	61	Sangre humana	Dacron color blanco	4+	4+
84	58	Sangre humana	Cartulina color blanca	4+	4+
85	59	Sangre humana	Lino color fucsia	4+	3+
86	62	Soda caustica	Poliéster color blanco	4+	4+
87	89	Sangre humana	Algodón color blanco	3+	3+
88	93	Acido acético	Algodón color vino tinto	3+	2+
89	94	Sangre humana	Poliéster color blanco, con soda cáustica solida	3+	3+
90	64	Sangre humana	Algodón color vino tinto, lavado con detergente	4+	3+
91	65	Sangre humana	Licra color rosada, con limón	3+	3+
92	66	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometidos a luz U.V /2h	4+	4+
93	72	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 60°C /2h	4+	4+
94	67	Sangre humana	Algodón color amarillo, con H2O2	4+	4+
95	73	Sangre humana	Algodón color vino tinto, con Hipoclorito	4+	4+
96	78	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro, sometido a 30°C /2h	4+	4+

Continuación Tabla # 13 Repetibilidad para el Analista # 2 / DÍA #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
				HORA 7:00 a 12:00	HORA 14:15 a 17:00
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	Poliéster viscoso color azul claro	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	Poliéster viscoso color azul claro	NEG	NEG
97	79	Sangre humana	Tableta color blanca, de 37x37 cm aprox, lavada con agua de chorro, con luz U.V/2h	4+	4+
98	80	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, limpiada con limpia vidrios con luz U.V/ 2h	4+	4+
99	81	Sangre humana	Tableta color beige, de 18x18 cm aprox, pintada, con luz U.V/ 2h	4+	4+
100	75	Sangre humana	Licra color rosada, lavada 10 veces con agua + luz U.V/2h	4+	4+

6.2 Reproducibilidad

Se empleó para expresar la precisión de la técnica cuando este se aplicó sobre la misma muestra, bajo las mismas condiciones, con los mismos reactivos, pero con diferente analista.

6.2.1 Resultados de la reproducibilidad para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón:

Tabla # 14 Reproducibilidad para el Analista # 1 y # 2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 1		Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	NEG	NEG	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	NEG	NEG	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	NEG	NEG	NEG	NEG
4	11	Rábano	NEG	NEG	NEG	NEG
5	15	Remolacha	1+	1+	2+	2+
6	20	Cirueta	NEG	NEG	NEG	NEG

Continuación Tabla # 14 Reproducibilidad para el Analista # 1 y # 2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 1		Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	NEG	NEG	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	NEG	NEG	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	NEG	NEG	NEG	NEG
10	5	Uva morada	NEG	NEG	NEG	NEG
11	1	Berenjena	NEG	NEG	NEG	NEG
12	4	Mora	2+	2+	2+	2+
13	10	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	3+	3+	2+	2+
15	12	Sangre de cerdo	4+	4+	3+	3+
16	21	Sangre de res	4+	4+	3+	3+
17	76	Sangre de pollo	4+	4+	3+	3+
18	13	Isodine	3+	3+	3+	3+
19	16	Cloruro férrico	2+	2+	2+	2+
20	26	Vino tinto	NEG	NEG	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	1+	1+	1+	1+
22	37	Sulfato de Zinc	NEG	NEG	NEG	NEG
23	40	Sulfato de hierro	2+	2+	2+	2+
24	18	Orina	NEG	NEG	NEG	NEG
25	29	Saliva	NEG	NEG	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
27	22	Sangre humana / pintura roja	4+	4+	3+	3+
28	23	Pintura roja	NEG	NEG	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	NEG	NEG	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	NEG	NEG	NEG	NEG
33	24	Permanganato de potasio	NEG	NEG	NEG	NEG
34	25	Oxido de tornillos	NEG	NEG	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	NEG	NEG	NEG	NEG
36	74	Detergente	3+	3+	2+	2+
37	77	Limpia vidrios	NEG	NEG	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	NEG	NEG	NEG	NEG
39	35	Marcador rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	NEG	NEG	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	NEG	NEG	NEG	NEG
42	82	Sudor	NEG	NEG	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	NEG	NEG	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	NEG	NEG	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
46	32	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
47	90	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
48	97	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
49	33	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
50	36	Sangre humana	4+	4+	4+	4+

Continuación Tabla # 14 Reproducibilidad para el Analista # 1 y # 2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 1		Thevenon Roland Piramidón ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
51	34	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
52	41	Sangre humana	4+	4+	4+	3+
53	69	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
54	42	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
55	55	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
56	43	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
57	68	Lugol	2+	2+	3+	2+
58	95	Pepa aguacate	NEG	NEG	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
60	87	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
61	98	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
62	100	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
63	46	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
64	39	Sangre humana	4+	4+	4+	3+
65	47	Sangre humana	3+	3+	2+	2+
66	45	Diente de león	NEG	NEG	NEG	NEG
67	50	Lenteja	NEG	NEG	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	NEG	NEG	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	NEG	NEG	NEG	NEG
70	83	Fresa	NEG	NEG	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	NEG	NEG	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	NEG	NEG	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
76	52	Tornillo oxidado	NEG	NEG	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	NEG	NEG	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	NEG	NEG	NEG	NEG
79	54	Cilantro	NEG	NEG	NEG	NEG
80	56	Soflan	NEG	NEG	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
82	57	Sangre humana	3+	3+	2+	2+
83	61	Sangre humana	2+	2+	1+	1+
84	58	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
85	59	Sangre humana	4+	4+	2+	POS
86	62	Soda caustica	NEG	NEG	NEG	NEG
87	89	Sangre humana	4+	4+	POS	POS
88	93	Acido acético	NEG	NEG	NEG	NEG
89	94	Sangre humana	NEG	NEG	NEG	NEG
90	64	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
91	65	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
92	66	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
93	72	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
94	67	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
95	73	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
96	78	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
97	79	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
98	80	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
99	81	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
100	75	Sangre humana	2+	2+	2+	2+

6.2.2 Resultados de la reproducibilidad para la Técnica de Bluestar Forensic Free

Tabla # 15 Reproducibilidad para el Analista # 1 y #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Bluestar Forensic Free ANALISTA # 1		Bluestar Forensic Free ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
1	9	Plátano Verde	NEG	NEG	NEG	NEG
2	2	Cebolla cabezona	NEG	NEG	NEG	NEG
3	8	Repollo morado	NEG	NEG	NEG	NEG
4	11	Rábano	2+	2+	2+	2+
5	15	Remolacha	NEG	NEG	NEG	NEG
6	20	Ciruela	NEG	NEG	NEG	NEG
7	14	Zanahoria	NEG	NEG	NEG	NEG
8	3	Tomate de árbol	NEG	NEG	NEG	NEG
9	7	Manzana roja	NEG	NEG	NEG	NEG
10	5	Uva morada	NEG	NEG	NEG	NEG
11	1	Berenjena	NEG	NEG	NEG	NEG
12	4	Mora	NEG	NEG	NEG	NEG
13	10	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
14	6	Sangre de pescado	3+	3+	3+	3+
15	12	Sangre de cerdo	4+	4+	3+	3+
16	21	Sangre de res	4+	4+	4+	4+
17	76	Sangre de pollo	4+	4+	3+	3+
18	13	Isodine	3+	3+	3+	2+
19	16	Cloruro férrico	1+	1+	1+	1+
20	26	Vino tinto	NEG	NEG	NEG	NEG
21	17	Tiocianato de potasio	1+	1+	2+	2+
22	37	Sulfato de Zinc	1+	1+	1+	1+
23	40	Sulfato de hierro	3+	3+	3+	3+
24	18	Orina	NEG	NEG	NEG	NEG
25	29	Saliva	NEG	NEG	NEG	NEG
26	19	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
27	22	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
28	23	Pintura roja	NEG	NEG	NEG	NEG
29	44	Labial rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
30	30	Peróxido de hidrogeno (H2O2)	NEG	NEG	NEG	NEG
31	63	Esmalte rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
32	99	Perborato de potasio	1+	1+	1+	1+
33	24	Permanganato de potasio	1+	1+	2+	2+
34	25	Oxido de tornillos	NEG	NEG	NEG	NEG
35	70	Hipoclorito	4+	4+	3+	3+
36	74	Detergente	3+	3+	3+	3+
37	77	Limpia vidrios	NEG	NEG	NEG	NEG
38	27	Amoniaco	1+	1+	1+	1+
39	35	Marcador rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
40	28	Rosas rojas	NEG	NEG	NEG	NEG
41	31	Materia fecal	NEG	NEG	NEG	NEG
42	82	Sudor	NEG	NEG	NEG	NEG
43	71	Hojas de árbol	NEG	NEG	NEG	NEG
44	38	Sulfato de magnesio	NEG	NEG	NEG	NEG

Continuación Tabla # 15 Reproducibilidad para el Analista # 1 y #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Bluestar Forensic Free ANALISTA # 1		Bluestar Forensic Free ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
45	96	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
46	32	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
47	90	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
48	97	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
49	33	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
50	36	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
51	34	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
52	41	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
53	69	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
54	42	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
55	55	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
56	43	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
57	68	Lugol	2+	2+	3+	3+
58	95	Pepa aguacate	NEG	NEG	NEG	NEG
59	88	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
60	87	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
61	98	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
62	100	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
63	46	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
64	39	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
65	47	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
66	45	Diente de león	NEG	NEG	NEG	NEG
67	50	Lenteja	NEG	NEG	NEG	NEG
68	48	Alcohol antiséptico	NEG	NEG	NEG	NEG
69	49	Betún líquido	NEG	NEG	NEG	NEG
70	83	Fresa	NEG	NEG	NEG	NEG
71	86	Lápiz de ojos	NEG	NEG	NEG	NEG
72	84	Rubor rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
73	51	Dolex gripa para niños	NEG	NEG	NEG	NEG
74	85	Noraver garganta rojo	NEG	NEG	NEG	NEG
75	91	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
76	52	Tornillo oxidado	NEG	NEG	NEG	NEG
77	92	Crema de manos	NEG	NEG	NEG	NEG
78	53	Salsa Barb QB	NEG	NEG	NEG	NEG
79	54	Cilantro	NEG	NEG	NEG	NEG
80	56	Soflan	NEG	NEG	NEG	NEG
81	60	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
82	57	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
83	61	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
84	58	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
85	59	Sangre humana	4+	3+	4+	3+
86	62	Soda caustica	4+	4+	4+	4+
87	89	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
88	93	Acido acético	2+	2+	3+	2+
89	94	Sangre humana	3+	3+	3+	3+
90	64	Sangre humana	4+	4+	4+	3+
91	65	Sangre humana	4+	4+	3+	3+
92	66	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
93	72	Sangre humana	4+	4+	4+	4+

Continuación Tabla # 15 Reproducibilidad para el Analista # 1 y #2.

ORDEN	Código de Muestra	ESPÉCIMEN (MANCHA DE)	Bluestar Forensic Free ANALISTA # 1		Bluestar Forensic Free ANALISTA # 2	
-----	CONTROL POSITIVO	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
-----	CONTROL NEGATIVO	Agua destilada	NEG	NEG	NEG	NEG
94	67	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
95	73	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
96	78	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
97	79	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
98	80	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
99	81	Sangre humana	4+	4+	4+	4+
100	75	Sangre humana	4+	4+	4+	4+

6.3 Limite de detección para las técnicas de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free.

6.3.1 Limite de detección para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón.

Tabla # 16 Limite de detección para diluciones de sangre en mancha

ORDEN	ESPÉCIMEN (MANCHA)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	
			Analista # 1	Analista # 2
1	Sangre Humana 1/1000	Tela garza blanca	Positivo 4+	Positivo 4+
2	Sangre Humana 1/2000	Tela garza blanca	Positivo 3+	Positivo 3+
3	Sangre Humana 1/4000	Tela garza blanca	Positivo 2+	Positivo 2+
4	Sangre Humana 1/8000	Tela garza blanca	Positivo 2+	Positivo 2+
5	Sangre Humana 1/16000	Tela garza blanca	Positivo 1+	Positivo 1+
6	Sangre Humana 1/32000	Tela garza blanca	Positivo 1+	Positivo 1+
7	Sangre Humana 1/64000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
8	Sangre Humana 1/128000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
9	Sangre Humana 1/256000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo

Tabla #16: El punto crítico de corte para la técnica de Thevenon Roland-Piramidón en diluciones de manchas de sangre, es la dilución 1/32000, que corresponde a **positivo 1+**, porque hay total coincidencia en los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

Tabla # 17 Limite de detección para diluciones de sangre líquida

ORDEN	ESPÉCIMEN (LIQUIDA)	SUSTRATO O SOPORTE	THEVENON ROLAND- PIRAMIDÓN	
			Analista #1	Analista #2
1	Sangre Humana 1/1000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 4+	Positivo 4+
2	Sangre Humana 1/2000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 4+	Positivo 4+
3	Sangre Humana 1/4000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 3+	Positivo 3+
4	Sangre Humana 1/8000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 3+	Positivo 3+
5	Sangre Humana 1/16000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 2+	Positivo 2+
6	Sangre Humana 1/32000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo 1+	Positivo 1+
7	Sangre Humana 1/64000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo
8	Sangre Humana 1/128000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo
9	Sangre Humana 1/256000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo

Tabla #17: El punto crítico de corte para la técnica del Thevenon Roland-Piramidón diluciones de sangre líquida, es la dilución 1/32000 que corresponde a **positivo 1+**, porque hay total coincidencia en los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

6.3.2 Limite de detección para la Técnica de Bluestar Forensic Free

Tabla # 18 Limite de detección para diluciones de sangre en mancha

ORDEN	ESPÉCIMEN (MANCHA)	SUSTRATO O SOPORTE	BLUESTAR FORENSIC FREE	
			Analista # 1	Analista # 2
1	Sangre Humana 1/1000	Tela garza blanca	Positivo 4+	Positivo 4+
2	Sangre Humana 1/2000	Tela garza blanca	Positivo 3+	Positivo 3+
3	Sangre Humana 1/4000	Tela garza blanca	Positivo 2+	Positivo 2+
4	Sangre Humana 1/8000	Tela garza blanca	Positivo 2+	Positivo 2+
5	Sangre Humana 1/16000	Tela garza blanca	Positivo 1+	Positivo 1+
6	Sangre Humana 1/32000	Tela garza blanca	Positivo 1+	Positivo 1+
7	Sangre Humana 1/64000	Tela garza blanca	Traza	Negativo
8	Sangre Humana 1/128000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
9	Sangre Humana 1/256000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo

Tabla #18: El punto crítico de corte para la técnica del Bluestar Forensic Free en diluciones de sangre en mancha, es la dilución 1/32000 que corresponde a **positivo 1+**, porque hay total coincidencia en los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

6.4 Manchas sometidas a RapidSignal Occult Blood Cassette – Organics, previamente analizadas con Bluestar Forensic Free

Se utilizaron muestras de sangre humana, que arrojaron resultados positivos mayores de (3 +) Bluestar Forensic Free; para saber si la acción del alcali del Bluestar Forensic Free pudiese haber afectado la determinación de la proteína humana. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla # 19 Resultados de las manchas de sangre humana sometidas a RapidSignal Occult Blood Cassette – Organics, previamente analizadas con Bluestar Forensic Free.

Código de Muestra	ESPÉCIMEN	Muestras sometidas a BLUESTAR FORENSIC FREE	OCCULT BLOOD CASSETTE ORGENICS
10	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
96	Sangre humana (papel)	POSITIVO	POSITIVO
32	Sangre humana (papel)	POSITIVO	POSITIVO
90	Sangre humana (papel)	POSITIVO	POSITIVO
97	Sangre humana (vidrio)	POSITIVO	POSITIVO
33	Sangre humana (Botella)	POSITIVO	POSITIVO
36	Sangre humana (Mechas de traperero)	POSITIVO	POSITIVO
34	Sangre humana (Espuma)	POSITIVO	POSITIVO
41	Sangre humana + sudor (tela)	POSITIVO	POSITIVO
69	Sangre humana + orina (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
42	Sangre humana + saliva (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
55	Sangre humana + materia fecal (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
43	Sangre humana (lavada 10 veces)	POSITIVO	NEGATIVO
88	Sangre humana (Tableta lavada)	POSITIVO	NEGATIVO
87	Sangre humana (Tableta)	POSITIVO	POSITIVO
98	Sangre humana (Tableta)	POSITIVO	POSITIVO
100	Sangre humana (Tableta limpiada con limpiavidrios)	POSITIVO	NEGATIVO
46	Sangre humana (Tableta pintada)	POSITIVO	NEGATIVO
39	Sangre humana (Trozo de madera)	POSITIVO	POSITIVO
47	Sangre humana (Malla)	POSITIVO	POSITIVO
91	Sangre humana (Papel)	POSITIVO	POSITIVO
60	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
57	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
61	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
58	Sangre humana (Cartulina)	POSITIVO	POSITIVO
59	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	NEGATIVO
89	Sangre humana (Tela)	POSITIVO	POSITIVO

Continuación Tabla # 19 Resultados de las manchas de sangre humana sometidas a RapidSignal Occult Blood Cassette – Organics, previamente analizadas con Bluestar Forensic Free.

Código de Muestra	ESPÉCIMEN	Muestras sometidas a BLUESTAR FORENSIC FREE	OCCULT BLOOD CASSETTE ORGENICS
94	Sangre humana + soda caustica)	POSITIVO	POSITIVO
64	Sangre humana + detergente	POSITIVO	POSITIVO
65	Sangre humana + limón	POSITIVO	POSITIVO
66	Sangre humana + Luz U.V. (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
72	Sangre humana + 60°C (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
67	Sangre humana + H ₂ O ₂ (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
73	Sangre humana + Hipoclorito (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
78	Sangre humana + 30°C (Tela)	POSITIVO	POSITIVO
79	Sangre humana + luz U.V (Tableta lavada)	POSITIVO	NEGATIVO
80	Sangre humana + Luz U.V (Tableta limpiada con limpia vidrios)	POSITIVO	NEGATIVO
81	Sangre humana + Luz U.V (Tableta pintada)	POSITIVO	NEGATIVO
75	Sangre humana + Luz U.V (Tela lavada)	POSITIVO	NEGATIVO

Tabla # 19: En esta tabla se puede observar que las manchas de sangre sometidas a Bluestar Forensic Free y cuyos resultados fueron positivos; al ser analizadas con la técnica OCCULT BLOOD CASSETTE ORGENICS a pesar de que las manchas tenían sangre, algunas de ellas arrojaron resultados negativos para la determinación de su origen humano.

Para comprobar los resultados anteriores se realizaron diluciones de sangre en mancha y líquida para la técnica de Occult Blood Cassette-Organics. Los resultados se pueden observar en la tabla # 13.

Tabla #20 Resultados para la Técnica de RapidSignal Occult Blood Cassette-Organics en diluciones de sangre humana líquida.

ORDEN	ESPÉCIMEN (LIQUIDA)	SUSTRATO O SOPORTE	Occult Blood Cassette-Organics	
			Analista #1	Analista #2
1	Sangre Humana 1/1000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
2	Sangre Humana 1/2000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
3	Sangre Humana 1/4000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
4	Sangre Humana 1/8000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
5	Sangre Humana 1/16000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
6	Sangre Humana 1/32000	Sangre líquida + agua destilada	Positivo	Positivo
7	Sangre Humana 1/64000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo
8	Sangre Humana 1/128000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo
9	Sangre Humana 1/256000	Sangre líquida + agua destilada	Negativo	Negativo

Tabla # 20: Se obtuvieron los mismos resultados para los dos analistas. Se determinó el punto crítico de corte en la dilución **1/32000** en sangre líquida.

Tabla # 21 Resultados para la Técnica de RapidSignal Occult Blood Cassette-Organics en diluciones de sangre humana en mancha.

ORDEN	ESPÉCIMEN (LIQUIDA)	SUSTRATO O SOPORTE	RapidSignal Occult Blood Cassette-Organics	
			Analista #1	Analista #2
1	Sangre Humana 1/1000	Tela garza blanca	Positivo	Positivo
2	Sangre Humana 1/2000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
3	Sangre Humana 1/4000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
4	Sangre Humana 1/8000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
5	Sangre Humana 1/16000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
6	Sangre Humana 1/32000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
7	Sangre Humana 1/64000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
8	Sangre Humana 1/128000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo
9	Sangre Humana 1/256000	Tela garza blanca	Negativo	Negativo

Tabla # 21: Se obtuvieron los mismos resultados para los dos analistas. Se determinó el punto crítico de corte en la dilución **1/1000** para sangre humana en mancha.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada uno de los resultados obtenidos de las dos técnicas se emplearon análisis estadísticos para pruebas cualitativas y para conocer el valor numérico de sus atributos.

7.1 Técnica de Thevenon Roland-Piramidón para los dos analistas

Se hallaron los resultados estadísticos empleando una tabla de 2 x 2 como herramienta de análisis, estos resultados se tabularon en las casillas de la siguiente manera: (a) Verdaderos positivos, (b) Falsos positivos, (c) Falsos negativos y (d) Verdaderos negativos, datos con los cuales se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de concordancia e índice de Kappa; y se halló el límite de detección para las dos técnicas de acuerdo a cada uno de los resultados obtenidos para los dos analistas⁵¹.

	RESULTADOS POSITIVO	RESULTADOS NEGATIVO
RESULTADOS POSITIVOS	<u>a</u> Verdaderos Positivos	<u>b</u> Falsos positivos
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> Falsos negativos	<u>d</u> Verdaderos negativos

⁵¹ MANRIQUE HERNANDEZ RUBEN. Manual de referencia para la validación de técnicas analíticas. INMLyCF. 1995. Página 7.

RESULTADO POSITIVO RESULTADO NEGATIVO

RESULTADOS POSITIVOS	<u>a</u> 44	<u>b</u> 8
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> 1	<u>d</u> 47

Sensibilidad:

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{44}{44+1} = 0.9777$$

Especificidad:

$$E = \frac{d}{d+b} = \frac{47}{47+8} = 0.8545$$

Valor predictivo positivo:

$$VPP = \frac{a}{a+b} = \frac{44}{44+8} = 0.8461$$

Valor predictivo negativo:

$$VPN = \frac{d}{d+c} = \frac{47}{47+1} = 0.9791$$

7.2 Técnica de Bluestar Forensic Free para los dos analistas

RESULTADOS POSITIVO RESULTADOS NEGATIVO

RESULTADOS POSITIVOS	<u>a</u> 45	<u>b</u> 14
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> 0	<u>d</u> 41

Sensibilidad:

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{45}{45+0} = 1.0$$

Especificidad:

$$E = \frac{d}{d+b} = \frac{41}{41+14} = 0.7454$$

Valor predictivo positivo:

$$VPP = \frac{a}{a+b} = \frac{45}{45+14} = 0.7627$$

Valor predictivo negativo:

$$VPN = \frac{d}{d+c} = \frac{41}{41+0} = 1.0$$

7.3 Índice de Concordancia para la Técnica Thevenon Roland-Piramidón entre los dos analistas

RESULTADOS POSITIVOS RESULTADOS NEGATIVO

RESULTADOS POSITIVOS	<u>a</u> Positivos Analista 1 Positivos Analista 2	<u>b</u> Positivos Analista 1 Negativo Analista 2
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> Negativos Analista 1 Positivos Analista 2	<u>d</u> Negativos Analista 1 Negativo Analista 2

RESULTADOS POSITIVOS RESULTADOS NEGATIVO

RESULTADOS POSITIVOS	<u>a</u> 88	<u>b</u> 16
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> 2	<u>d</u> 94

$$PC = \frac{a+d}{a+b+c+d} = \frac{88+94}{88+16+2+94} = \frac{182}{200} = 0.91$$

7.4 Índice de Concordancia para la técnica de Bluestar Forensic Free entre los dos analistas

PC: Índice de concordancia

	RESULTADOS POSITIVOS	RESULTADOS NEGATIVO
RESULTADOS POSITIVOS	<u>A</u> 90	<u>b</u> 28
RESULTADOS NEGATIVOS	<u>c</u> 0	<u>d</u> 82

$$PC = \frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{90 + 82}{90 + 28 + 0 + 82} = \frac{172}{200} = 0.86$$

7.5 Índice de Kappa para Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free:

W	a + c	89 + 1	90
X	b + d	22 + 88	110
Y	a + b	89 + 22	111
Z	c + d	1 + 88	89
T	a + b + c + d	89 + 22 + 1 + 88	200

Concordancia al azar:

$$\text{concordancia al azar} = \frac{(W \times Y) + (X \times Z)}{t \times t}$$

$$\text{concordancia al azar} = \frac{(90 \times 111) + (110 \times 89)}{200 \times 200} = \frac{(9990) + (9790)}{40000}$$

$$\text{concordancia al azar} = \frac{19780}{40000} = 0.4945$$

Concordancia observada:

$$\text{concordancia observada} = \frac{a + d}{t}$$

$$\text{concordancia observada} = \frac{a + d}{t} = \frac{89 + 88}{200} = \frac{177}{200} = 0.885$$

Índice Kappa

$$K = \frac{\text{Concordancia observada} - \text{concordancia al azar}}{1 - \text{Concordancia por azar}}$$

$$K = \frac{0.885 - 0.4945}{1 - 0.4945} = \frac{0.3905}{0.5055} = 0.7725$$

Interpretación de los valores del Índice de Concordancia y el Índice de Kappa⁵²

Valor de Kappa	Fuerza de la Concordancia
< 0	Pobre
0 – 0.20	Leve

⁵² RUIZ MORALES ALVARO. MORILLO ZARATE LUIS. Epidemiología clínica, investigación clínica aplicada. Editorial medica internacional.2004. Capitulo 17, pagina 295.

0.21 – 0.40	Baja
0.41 – 0.60	Moderada
0.60 – 0.80	Buena
0.81 – 1.0	Casi perfecta

Tabla #22: Los datos están informados en valores de probabilidad, siendo la más baja de (0) cero y la más alta (1) uno

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En éste estudio realizamos la **VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS BLUESTAR FORENSIC FREE Y THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN COMO PRUEBAS PRELIMINARES EN LA INVESTIGACIÓN DE SANGRE DE INTERÉS FORENSE**, demostrando que las técnicas Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón son pruebas muy rápidas, de bajo costo, de fácil aplicación, para su lectura no requiere de equipos sofisticados, son altamente sensibles y presentan una especificidad mayor al 80%, lo que las hace muy útiles en la marcha analítica para la investigación de manchas de sangre de interés forense.

Confrontando los parámetros de calidad analizados: Sensibilidad, Especificidad, Índice de Concordancia, Índice de Kappa, Limite de Detección, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo, hallados en este estudio frente a los encontrados en otras regionales del país del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses para la técnica Thevenon Roland-Piramidón, se puede evidenciar que entre la ciudad de Pereira 2004 y Bogotá 2009, los datos de sensibilidad, especificidad, los valores predictivos positivos y negativos, fueron totalmente concordantes entre sí y además el límite de detección fue muy superior a los encontrados en validaciones realizados en Cali (2004), Medellín (2004), Bucaramanga (2004) y Bogotá 2003. Esta se puede deber a la aplicación de diseños experimentales diferentes. (Ver tabla #23).

TABLA # 23. ATRIBUTOS COMPARATIVOS DE THEVENON-ROLAND-PIRAMIDÓN CON OTRAS REGIONALES DEL PAÍS INMLyCF

PARAMETROS	PEREIRA 2004		CALI 2004	MEDELLIN 2004	B/MANGA 2004	BOGOTA 2003	BOGOTA 2009
	Merck	Aldrich					
Sensibilidad	0.9795	0.9795	1	1	0.9233	1	0.9777
Especificidad	0.8545	0.8545	1	0.9	0.6250	0.9	0.8545
Índice de concordancia	1	1	1	1	0.91	1	0.91

Índice kappa	1	1	1	1	0.80	1	0.7725
Limite de detección	Sangre líquida 1/32.000	Sangre líquida 1/32.000	Sangre líquida 1/1024	Sangre líquida 1/2580	Sangre líquida No aplica	Sangre líquida 1/5000	Sangre líquida 1/32000
	Sangre mancha 1/32.000	Sangre mancha 1/32.000	Sangre mancha 1/1056	Sangre mancha 1/200	Sangre mancha No aplica	sangre mancha 1/100	sangre mancha 1/32000
Valor predictivo positivo	0.8571	0.8571	1	0.9	0.9	0.9	0.8461
Valor predictivo negativo	0.9791	0.9791	1	1	0.6818	1	0.9791

Respecto a otros estudios similares al nuestro, no fue posible comparar estos mismos parámetros de análisis, ya que estas investigaciones no reportan resultados de valores predictivos, índice de concordancia, índice de Kappa, solo indagan el limite de detección que para nosotros fue de 1/32.000 para la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón, muy superior a lo reportado por **CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A**, estudio en el cual hallaron el limite de detección con las pruebas de O-Toluidina, Tetrametilbenzidina, Fenolftaleína y Verde de Leucomalaquita. Encontraron que para la prueba de O-Toluidina el limite de detección es de 1/2.000 en solución, encontraron para la prueba Tetrametilbenzidina 1/400.000, mientras que para el Verde de Leucomalaquita fue de 1/200.000 y para la Fenolftaleína 1/2.000⁵³.

Para el Bluestar Forensic Free los parámetros evaluados arrojaron resultados de una Sensibilidad de 1.0, Especificidad de 0.74, Valor Predictivo Positivo de 0.76, Valor Predictivo Negativo de 1.0, Índice de Concordancia de 0.86 e Índice de Kappa 0.77, con un Limite de Detección igual a la Técnica de Thevenon Roland-Piramidón 1/32.000 para manchas de sangre, realizando diluciones en base 2, partiendo de una dilución 1/1.000 hasta 1/256.000. En la publicación sobre la comparación del Luminol y el Bluestar como pruebas presuntivas para detectar manchas de sangre por **Samantha Webb**, los resultados arrojaron que el Luminol

⁵³ **CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A.** *Critical revision of presumptive tests for bloodstains.* Department of Legal Medicine. College of Medicina and Odontology univetsity. Valencia, España. Forensic science communications. Julio de 1999, volumen 1, No.2.

presentaba mayor efectividad en temperaturas más elevadas, en cambio el Bluestar no demostró ningún cambio en su efectividad por la temperatura. No se presento gran diferencia a la hora de comparar las manchas más antiguas de las recientes, siendo la efectividad de los reactivos buena. En este estudio se concluyó que el Bluestar reacciona mejor que el Luminol en todos los sustratos. No se detectaron manchas de sangre en las diluciones 1/100.000 y 1/1.000.000, de manera que el limite de detección del Bluestar y el Luminol fue de 1/10.000, siendo el Bluestar mas quimioluminiscente, por ser más duradero y de más intensidad al momento de la reacción.

Nuestro estudio también tiene similitud con algunos parámetros de la validación realizada por los autores: **MR. Villegas, et al.** Ellos utilizaron las técnicas del Luminol, Fenolftaleína y Piramidón, como indicadores de la existencia de sangre, sometiendo muestras conocidas a diferentes condiciones de temperatura, clase de soporte, dilución y tiempo de exposición. Realizaron manchas de sangre humana sobre soportes como algodón, tela de algodón, seda, lino, jean y se expusieron a temperaturas de -20°C, 4°C, 37°C y 60°C por periodos de tiempo de 24 horas, una semana y un mes; en la **Validación de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free** se utilizaron estos y además muchas soportes, dentro de los cuales se encuentran, poliéster, algodón, lino, lycra, toalla, jeans, cuerina, cuero, papel, vidrio, mechas de trapero, espuma, tabletas de baldosa, malla, trozo de madera, tornillo, estos sustratos no interfirieron ni tampoco inhibieron la reacción de color o la emisión de luz azul brillante, cuando se sometieron a diferentes sustancias, permitiendo que realizaran su acción normalmente. Otros, se trabajaron a temperaturas de 30°C y 60°C, pero con la diferencia que se utilizaron periodos de tiempo más cortos de aproximadamente dos horas. Se obtuvieron los rangos de temperatura entre 20°C y 26.6°C, y de humedad entre 30% y 50% en los cuales se montaron las dos técnicas, datos obtenidos del Servicio de Metrología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, mediciones realizadas con un termohigrómetro (Marca Luff, Modelo Opus II, N° de serie C76:1911; C12:1591); el grado de concordancia entre los resultados de

ensayos sucesivos de una misma característica, obtenidos con el mismo método, por los mismos analistas, con los mismos instrumentos de medida, en el mismo laboratorio, comprobaron que tanto la técnica de Thevenon Roland Piramidón como la técnica de Bluestar Forensic Free, fueron **Repetibles** y **Reproducibles**. Con el fin de evaluar la interferencia de sustancias que puedan generar resultados **falsos positivos** en la técnica de Piramidón, **MR. Villegas, et al**, hicieron manchas sobre tela de algodón de las siguientes frutas: Banano, Cereza, Ciruela, Durazno, Fresa, Limón, Mandarina, Manzana, Melón, Mora, Naranja, Pera, Piña y Uva roja; Verduras: Cebolla, Rábano, Papa, Espinaca, Uva verde, Aguacate, Fríjol rojo, Repollo, Zanahoria, Coliflor, Maíz, Apio, Pepino Cohombro, Berenjena, Ajo, Lechuga, Tomate, Remolacha y Pimentón; Otras sustancias como: Vino tinto, Salsa de tomate, Café, Gelatina, Bebida carbonatada y Óxido; fluidos biológicos como saliva y orina. En nuestro muestreo, se utilizaron fluidos corporales como sudor, orina, saliva, materia fecal y productos vegetales como extractos de frutas y algunas plantas, tanto los fluidos como los vegetales poseen células ricas en lisosomas. A pesar de que la literatura refiere que las enzimas Peroxidasas y Catalasas pueden producir reacción positiva para el Thevenon Roland-Piramidón y para el Bluestar Forensic Free, en los resultados obtenidos se observó que es muy baja la capacidad reactiva de estas enzimas, ya que con Bluestar Forensic Free, se obtuvo emisión de luz azul brillante con la muestra de **rábano** además de las muestras que tenían sangre y/o agentes oxidoreductores, los rábanos son plantas de la familia de las Crucíferas, tiene gran cantidad de vitamina C que constituye un antioxidante y entre sus componentes se encuentran potasio, hidratos de carbono, sodio, fósforo, calcio, magnesio, hierro, zinc⁵⁴. Con Thevenon Roland-Piramidón se produjo reacción de color, además de las muestras de sangre, con la **remolacha** y la **mora**, sin embargo el color de estas dos últimas se produjo desde la adición del primer o segundo reactivo, por tanto el resultado fue Inconcluyente, más que positivo, dado el color parecido al de la leucobase. Además la remolacha es una planta de la familia de las Amarantáceas, son ricas en almidón, pero tienen

⁵⁴ **BOTANICAL**. Propiedad de los rábanos. <http://www.botanical-online.com/rabanos.htm>

otros componentes como hierro, sodio, potasio e hidratos de carbono⁵⁵, en cuanto a la mora esta posee valor nutritivo y es fruta tónica, laxante, refrescante y depurativa, contiene sales minerales, de manera especial calcio, fósforo y hierro⁵⁶. De lo anterior, podemos concluir que las técnicas Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón tienen gran sensibilidad para detectar agentes oxidoreductores y muy baja o casi ninguna capacidad para detectar enzimas como peroxidasas y catalasas. Con respecto a los resultados hallados en ambas validaciones se puede concluir que el test de Thevenon Roland-Piramidón demostró ser una excelente prueba presuntiva en diferentes soportes y condiciones. No se observaron resultados falsos positivos al analizar sustancias con apariencia similar a la sangre para ellos, pero en nuestro caso tuvimos como **falsos positivos** al rábano, la remolacha y la mora.

Sin embargo se debe tener en cuenta que existen ciertos tipos de telas que tienen la capacidad de decolorarse cuando se emplean los diferentes reactivos de la técnica Thevenon Roland-Piramidón, haciendo pensar cuando se finaliza el procedimiento analítico, que sí se trata de una mancha de sangre cuando no lo es. Algunos productos que fueron utilizados en este estudio como la remolacha o la mora, son similares al color de la sangre, estos también pueden soltar color cuando se utilizan los reactivos, dando como resultados falsos positivos, por ello es mejor utilizar una técnica como el **Verde de Leucomalaquita** cuya leucobase es de color verde si se trata de una mancha de sangre. En la validación de **GUTIÉRREZ, R. CARMONA A**, no se presentaron resultados inconcluyentes frente a los sustratos y productos empleados.

Cooper Quickendenand, demostró que también se puede producir quimioluminiscencia con algunos productos de limpieza para el hogar, tales como el cloro o los detergentes, sin embargo, las diferencias en la intensidad, espectro de emisión, y el tiempo de reacción entre los productos de limpieza y la sangre

⁵⁵ **BOTANICAL**. Propiedad de las remolachas. <http://www.botanical-online.com/remolachas.htm>

⁵⁶ **PROPIEDADES DE LAS FRUTAS**. La mora. <http://propiedadesfrutas.jaimaalkauzar.es>

son diferentes; es mucho mayor la intensidad de luz cuando se trata de sangre⁵⁷. Esta quimioluminiscencia puede ser la causa de los **falsos positivos** en ambas técnicas con el **detergente** y el **limpiavidrios**, y solo para el Bluestar con el **hipoclorito**, teniendo en cuenta que la emisión luz fue relevante en el momento de la reacción, verificando que estas no son específicas para sangre, también obtuvimos resultados falsos positivos con agentes oxido reductores como: **Isodine, sulfato de hierro, tiocianato de potasio, cloruro férrico, sulfato de zinc, perborato de potasio, permanganato de potasio, amoniaco, soda cáustica sólida y ácido acético**. Los componentes de algunos de estos elementos son: yodo povidona⁵⁸, carbonatos, perboratos, polifosfatos, urea, formol⁵⁹, hierro, sodio, potasio, magnesio, cloro, entre otros. Estas reacciones se presentaron por el cambio en el número de oxidación de los elementos, incluyendo una transferencia completa de electrones formando uniones iónicas o covalentes, efectuando una oxidación como resultado de la pérdida de electrones y una reducción como resultado de la ganancia de electrones.

En la investigación de pruebas presuntivas para manchas de sangre⁶⁰, los autores **Castelló Ponce Ana y Verdú Pascual Fernando**, analizaron las interferencias de los contaminantes con respecto a los **falsos negativos**, ellos realizaron estudios con diferentes contaminantes como el limón y ácido ascórbico (ricos en vitamina C), y encontraron inhibición de la oxidación por el peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasas; a la vez ellos se cuestionan si estos resultados se deben a la invisibilidad de las manchas de sangre, por haber estado en contacto con productos de alta capacidad para producir reacciones de oxido reducción (detergentes y alimentos). En la validación de Thevenon Roland-Piramidón se empleo el limón como posible sustancia inhibidora de la reacción sobre manchas

⁵⁷COOPER QUICKENDENAND. **French Defense Department Gendarmerie Nationale Criminal Research Institute Biology Department**. *The effect of the BlueStar Blood reagent on DNA typing*, 2001. <http://www.bluestar-forensic.com>

⁵⁸ **BOEHRINGER INGELHEIM S.A.** Distribución de medicamentos. Isodine. <http://www.dromayor.com.co>

⁵⁹ **LABORATORIO DE QUIMICA**. Detergente. <http://labquimica.wordpress.com>

⁶⁰ **CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A.** *Critical revision of presumptive tests for bloodstains*. Department of Legal Medicine. College of Medicina and Odontology univetsity. Valencia, España. Forensic science communications. Julio de 1999, volumen 1, No.2.

de sangre y arrojando resultados positivos, es decir no se evidencio interferencia con la técnica, utilizando la misma cantidad de sustancia (1 ml), e inclusive muestras sometidas a diferentes temperaturas y expuestas a luz ultra violeta, aun seguían arrojando resultados positivos, sin interferir en la adecuada lectura de la muestra.

La soda cáustica sólida en presencia de la mancha de sangre concentrada, fue una de las muestras utilizadas en el estudio de las dos técnicas, esta inhibió la reacción de oxido reducción, produciendo una reacción **falsa negativa** para la técnica de Thevenon Roland Piramidón. La Soda Cáustica es una base fuerte, altamente reactiva que se calienta espontáneamente en contacto con la humedad, es corrosiva, ataca metales como el zinc, aluminio, cobre, plomo, bronce, hierro, razón por la cual posiblemente inhibió la reacción del hierro presente en el grupo Hem de la hemoglobina de la sangre⁶¹. Una posible explicación es que estos elementos compiten por el poder reductor del oxígeno en el reactivo y evita la oxidación, a la vez se puede reducir el reactivo después de que se ha oxidado por el peróxido de hidrógeno, lo que impide la aparición de características de color debido a la ruptura del reactivo y su rápida desaparición.

En estudios experimentales realizados con el **Luminol**⁶², se ha demostrado que este es capaz de detectar sangre en muestras que han sido lavadas con agua de chorro, permitiendo delimitar las zonas donde aun hay trazas de sangre que no son visibles a simple vista; en nuestro estudio, el Bluestar Forensic Free demostró que hasta la decima (10) lavada con agua de chorro se puede detectar la presencia de sangre en la muestra analizada; los dos estudios lavaron las muestras de la misma manera, a la vez las pruebas de controles realizadas a cada uno de los soportes fueron negativas, de tal forma que se pudiera evaluar la efectividad del reactivo. Se trabajo en sitios cerrados donde no interfiriera la luz natural o artificial; y se determino que el uso del Luminol y el Bluestar son convenientes en muestras que aparentemente no tienen sangre. Los autores **Castelló Ponce, et al**, analizaron la sensibilidad del Luminol para encontrar

⁶¹ **INDUSTRIA BRINSA.** Soda caustica. <http://www.brinsa.com.co>

⁶² **NEGRE MUNOZ, M.C., CASTELLO PONCE, A., GIL PITARCH, P. ET AL.** *Bloodstains?: reliability of the presumptive test.* Cuadernos de medicina forense. 2003, No. 34. <http://scielo.isciii.es/scielo.php>.

manchas de sangre que han sido lavadas para tratar de eliminar los vestigios de esta, los resultados mostraron que se puede extraer y amplificar DNA en muestras sometidas a 1, 2, y 3 lavadas, y que el Luminol es muy eficaz para detectar indicios invisibles de manchas de sangre que han sido lavadas hasta 10 veces⁶³. Tanto el Thevenon Roland-Piramidón como el Bluestar Forensic Free utilizaron sustratos o soportes que fueron sometidos a procesos de limpieza, lavado y pintura, no presentaron ningún inconveniente para detectar manchas de sangre, sin importar los mecanismos que se utilizaron para eliminar los rastros de ella.

Con respecto a si la técnica de Bluestar se debe implementar o se debe excluir del esquema analítico para investigación de manchas de sangre, como prueba preliminar a la determinación de sangre humana, los resultados que obtuvimos fueron inconcluyentes. La razón es la siguiente:

Las muestras de sangre humana que fueron analizadas con Bluestar Forensic Free que arrojaron resultados positivos de 3+ o mas, fueron sometidas a la prueba para la detección de proteína humana mediante la técnica inmunocromatográfica RapidSignal Occult Blood Cassette Organisc, con el fin de conocer si la sustancia alcalina del Bluestar (perborato y/o peroxido de hidrogeno) habían alterado la estructura proteínica de la hemoglobina humana, impidiendo su identificación y/o posible unión con el anticuerpo monoclonal, presente en la membrana del casete de Organisc; arrojando resultados falsamente negativos para sangre humana.

Las muestras de sangre humana manchadas en 39 soportes diferentes, fueron sometidas a Bluestar y luego analizadas con Organisc, para proteína humana, 8 resultaron falsamente negativas para sangre humana; equivalente al 20%. De lo cual podríamos inferir, que el Bluestar si afectaría las muestras para análisis posteriores, como la determinación del origen humano de una mancha. Esta deducción debíamos confirmarla, pues era de gran relevancia.

⁶³ **Castelló Ponce, M. Alvarez, M. Miguel.** Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Cuadernos de Medicina Forense. Sevilla, abril 2002.

Por ello, debimos probar el comportamiento de la técnica inmunocromatográfica RapidSignal Occult Blood Cassette Organics, tanto para sangre humana en mancha como de sangre humana líquida, mediante el límite de detección.

Se realizaron diluciones de sangre humana tanto en mancha como líquida, y el límite de detección fue 1/1000 para sangre humana en mancha y 1/32000 para sangre humana líquida, este resultado se confirmó por triplicado. Lo cual es coherente con lo expresado en el inserto del kit, donde se señala que son pruebas para uso clínico en la detección de sangre oculta en materia fecal.

Los posibles falsos negativos (20%) de las muestras de sangre humana en mancha, no detectadas con Organisc se pueden deber a la sustancia alcalina del Bluestar, al bajo límite de detección de la marca Organisc para sangre humana en mancha o a la matriz diferente (mancha seca) sobre la cual realizamos la técnica en vez de la estipulada en el inserto (materia fecal fresca),

A partir de nuestro estudio se puede definir claramente los parámetros del desempeño de las técnicas Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free, en la siguiente tabla se presentan las principales diferencias encontradas para ambas técnicas:

Tabla # 24. Principales diferencias entre las técnicas Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free

THEVENON ROLAND-PIRAMIDÓN	BLUESTAR FORENSIC FREE
<ul style="list-style-type: none"> • Prueba coloreada 	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba quimioluminiscente
<ul style="list-style-type: none"> • pH de reacción ácida (4-5) 	<ul style="list-style-type: none"> • pH de reacción alcalina (desde 11.4)
<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de orientación para sangre 	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de ubicación para manchas de sangre
<ul style="list-style-type: none"> • Una reacción positiva se evidencia con la presencia de color violeta 	<ul style="list-style-type: none"> • Una reacción positiva se evidencia con la emisión de luz azul brillante
<ul style="list-style-type: none"> • Se utiliza sobre manchas visibles 	<ul style="list-style-type: none"> • Se utiliza sobre manchas no

	visibles, superficies que han sido lavadas, limpiadas o pintadas
<ul style="list-style-type: none"> • La técnica se realiza en las condiciones habituales del laboratorio. 	<ul style="list-style-type: none"> • La técnica se realiza en cuarto oscuro
<ul style="list-style-type: none"> • Los reactivos son estable por varios días 	<ul style="list-style-type: none"> • El reactivo una vez mezclado tiene una vida útil hasta (8) ocho horas
<ul style="list-style-type: none"> • Necesita el ácido acético para estabilizar la reacción 	<ul style="list-style-type: none"> • No necesita estabilizadores
<ul style="list-style-type: none"> • La reacción libera oxígeno para que este se una al sustrato y produzca color 	<ul style="list-style-type: none"> • La reacción libera nitrógeno, en forma de luz azul brillante.
<ul style="list-style-type: none"> • Se utiliza sobre cualquier elemento donde se observen manchas o se presuma que las hay. 	<ul style="list-style-type: none"> • Esta técnica solo se puede utilizar en escenas de campo cerrado.

Entre las semejanzas de las dos técnicas, se encuentran:

- Las dos técnicas actúan frente a agentes oxidoreductores y en menor medida frente a enzimas como las catalasas y las peroxidasas.
- Las dos técnicas son presuntivas o de orientación para manchas de sangre.
- Tanto la técnica de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free son muy sensibles, pero poco específicas para detectar muestras con sangre.
- El límite de detección para ambas técnicas es de 1/32000.

9. CONCLUSIONES

1. La técnica del Bluestar Forensic Free y la técnica del Thevenon Roland-Piramidón tienen una sensibilidad mayor de 0.97, con respecto a la especificidad es mejor la técnica del Thevenon Roland-Piramidón que llega a 0.85 contra 0.74 del Bluestar Forensic Free.
2. La concordancia para los dos analistas en la técnica Bluestar Forensic Free fue de 0.86, y la concordancia para los dos analistas en la técnica de Thevenon Roland-Piramidón fue de 0.91, siendo “**casi perfecta**”, el índice de Kappa entre las dos técnicas fue “**bueno**”, según la escala de la tabla #22, lo que significa que hay una muy buena reproducibilidad y repetibilidad.
3. El límite de detección para manchas y muestras líquidas de sangre de las técnicas de Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón es de 1/32000.
4. Los diferentes sustratos o soportes utilizados (poliéster, algodón, lino, lycra, toalla, jeans, cuerina, cuero, papel, vidrio, mechales de trapero, espuma, tabletas de baldosa, malla, trozo de madera, tornillo), en la validación de las técnicas de Thevenon Roland-Piramidón y Bluestar Forensic Free, no interfirieron ni tampoco inhibieron la reacción de color o la emisión de luz azul brillante.
5. En los rangos de temperatura, entre 20°C y 26.6°C, y de humedad, entre 30% y 50%, en los cuales se montaron las dos técnicas, se comprobó que los métodos fueron Repetibles y Reproducibles.
6. Las técnicas del Thevenon Roland-Piramidón y del Bluestar Forensic Free tienen la capacidad de detectar manchas de sangre que han sido lavadas,

limpiadas, pintadas o que han sido sometidas a diferentes temperaturas superiores a 30°C y hasta 60°C por dos (2) horas.

7. Tanto la técnica coloreada (Thevenon Roland-Piramidón) y la técnica quimioluminiscente (Bluestar Forensic Free), tienen la capacidad de detectar agentes oxido reductores y/o la presencia de enzimas peroxidasas o catalasas, dentro de los cuales se encuentra el hierro presente en el grupo Hem de la hemoglobina, sin embargo, éstas no son técnicas específicas para sangre, por lo tanto, también van a presentar reacción **Positiva** con otros agentes oxido reductores como: *Isodine, detergente, sulfato de hierro, tiocianato de potasio, cloruro férrico, sulfato de zinc, perborato de potasio, permanganato de potasio, hipoclorito, amoniaco, soda cáustica sólida y ácido acético.*
8. En el muestreo se utilizaron fluidos de origen humano como sudor, orina, saliva, materia fecal y sustancias de origen biológico vegetal como extractos de frutas y algunas plantas, ambos grupos poseen células ricas en lisosomas. A pesar de que la literatura refiere que las enzimas Peroxidasas y Catalasas pueden producir reacción **Positiva** para el Thevenon Roland-Piramidón y para el Bluestar Forensic Free, se puede concluir que ambas técnicas tienen gran sensibilidad para detectar agentes oxido reductores y muy baja o casi ninguna capacidad para detectar enzimas como peroxidasas y catalasas.
9. La soda cáustica sólida en presencia de la mancha de sangre concentrada, inhibió la reacción de oxido reducción, produciendo una reacción **falsa negativa** para la técnica de Thevenon Roland Piramidón.
10. La técnica del Bluestar Forensic Free y la técnica del Thevenon Roland-Piramidón son pruebas rápidas, de bajo costo, de fácil aplicación, para su lectura no requiere de equipos sofisticados, son altamente sensibles y medianamente específicos, por lo tanto se podrían utilizar en la marcha

analítica para la investigación de manchas de sangre de interés forense, siendo ambos altamente sensibles, con igual límite de detección (1/32000), pero siendo la técnica del Thevenon Roland-Piramidón más específica, sin presentar riesgo de alterar las muestras para análisis posteriores.

11. No se pudo concluir respecto a si posiblemente las muestras que tenían sangre humana y a las cuales se les aplicó el práctico Bluestar Forensic Free, se alteraron con la prueba inmunocromatográfica (RapidSignal Occult Blood Cassette Organics), o es que esta última técnica tiene muy bajo límite de detección de sangre humana en manchas (1/1000).

10. RECOMENDACIONES

- Se deben utilizar reactivos que se encuentran lejanos a su fecha de expiración, para evitar falsos positivos o falsos negativos en las técnicas utilizadas.
- Por cada lote de análisis se recomienda utilizar controles positivos y negativos con el fin de verificar la calidad de la buena marcha analítica del montaje; se debe montar controles positivos y negativos antes de montar los casos forenses para comprobar la efectividad de ellos.
- Se recomienda preparar la solución de trabajo #1 (Piramidón) frecuentemente, al igual que la solución de trabajo #3 (Peróxido de hidrogeno al 3%), ya que ofrecen más rápido desarrollo de la reacción, y el color persiste hasta después de un (1) minuto, en algunos casos.
- Se recomienda utilizar frascos color ámbar para guardar los reactivos preparados y preferiblemente almacenarlos en refrigeración de 2 a 8°C.
- La solución trabajo #1 (Piramidón), por ser un agente cromógeno, es muy inestable, y sensible a influencias ambientales como el aire, la luz, y la temperatura excesiva; con el oxígeno del aire puede producir una oxidación igual que puede ocurrir con la luz. Para la solución de trabajo #3 (Perhidrol) la refrigeración se hace con el fin de controlar la evaporación e impedir la alteración de la concentración.
- La lectura con la técnica Thevenon Roland-Piramidón es estable solo hasta (1) un minuto después de adicionar el último reactivo. Después de este tiempo el control negativo cambia de color y los controles positivos se van decolorando lo cual podría falsear los resultados y la interpretación de los mismos.

- Se recomienda aplicar un estricto control sobre el material sometido a lavado y que haya estado en contacto con algunas de las sustancias químicas que tiene la capacidad de oxidar los reactivos.
- La reacción se debe realizar sobre un trozo de algodón nuevo y estéril, colocándolo sobre cada pozo de la placa de toque o de la lámina excavada.
- Los resultados inconcluyentes, se pueden evitar utilizando la técnica de Verde de Leucomalaquita, ya que con este reactivo para el análisis de estas muestras, no se presentan resultados inconcluyentes.
- Se debe medir estrictamente el tiempo para la formación de color y para la emisión de luz azul brillante.
- Para la técnica de Bluestar Forensic Free se requiere cuarto oscuro, medidas de protección personal y que el reactivo una vez preparado se utilice inmediatamente, ya que el reactivo es estable hasta por ocho (8) horas; tiempos prolongados aumentan el pH y se empieza a degradar más fácil y rápidamente el ADN.
- Si se cuenta con una cámara fotográfica, se debe tener lista para tomar las fotografías en el momento de a la aplicación del Bluestar Forensic Free, puesto que la reacción se evidencia desde inmediatamente y hasta (2) dos minutos aproximadamente.
- Se debe reactivar la quimioluminiscencia de cada muestra de la zona a la cual se desea aplicar el Bluestar Forensic Free, para ubicar los puntos o manchas de color azul brillante en el momento de tomar las fotografías.

- El Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland Piramidón, son pruebas de orientación para detectar la presencia de sangre, esto significa que requiere de otras técnicas para la determinación de su especie.

10. BIBLIOGRAFÍA

ALVIANO NESTOR. Toxicología Laboral: Criterios para la vigilancia de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas.
<http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp>

AVIER DOMÉNECH, WILSON F. JARDIM Y MARTA I. LITTER. Potencial Redox de Agentes Oxidantes. 2004.
<http://www.miliarium.com/prontuario/Tablas/Quimica/PotencialRedox.htm>

ARTBIOCHEM. Peroxidasa,
<http://www.artbiochem.com/recursos/akpcespanol.pdf>

BUENDÍA RUBÉN. Laboratorio de gwen. Luminol: La confianza de un espectro. 2008. <http://ellaboratoriodegwen.blogspot.com>

BLUESTAR®. Reactivo Revelador para Manchas de Sangre oculta. Ciencia Forense.cl Revista On-Line de Criminalística. 2009.
<http://www.cienciaforense.cl/csi>

BLUESTAR. Ciencia Forense.cl Revista On-Line de Criminalística. 2009.
www.cienciaforense.com.

BLUESTAR FORENSIC. El mejor revelador de manchas de Sangre oculta en la escena del crimen. Madrid, España. www.bluestar-forensic.com

BLUESTAR FORENSIC. El mejor revelador de manchas de Sangre oculta en la escena del crimen. Madrid, España. www.bluestar-forensic.com

CASTELLÓ PONCE ANA y VERDÚ PASCUAL FERNANDO A. Critical revision of presumptive tests for bloodstains. Department of Legal Medicine. College of Medicina and Odontology university. Valencia, España. Forensic science communications. FBI, Julio de 1999, volumen 1, No.2.

CASTELLÓ PONCE ANA, VERDÚ PASCUAL FERNANDO, ALVAREZ SEGUI, FEUCHT MIGUEL. Development of Latent stains: effectiveness of luminol and

evaluation of its effect on DNA analysis. Cuadernos de Medicina Forense. Sevilla, España. 2002.

CONTRERAS JOSÉ DANIEL. Investigación Criminal 2007. <http://www.scribd.com>

CONTRERAS JOSÉ DANIEL. Investigación Criminal 2007. México. <http://www.scribd.com>

DILBECK, Lisa. Use of Bluestar Forensic in Lieu of Luminol at Crime Scenes. Journal of Forensic Identification, 2006. Páginas 56 (5).

ENZIMAS. RECONOCIMIENTOS DE LA CATALASAS.

<http://abcal.iespana.es/recursos/.catalasas>

EL INVESTIGADOR. Una formula basada en el luminol. 2009. <http://policiasenlared.blogspot.com>

GROSS ANN MARIE; HARRIS KATY AND KALDUN GARY, The Effect of Luminol on Presumptive Tests and DNA Analysis Using the Polymerase Chain Reaction, Journal of Forensic Sciences, 1999; Páginas:837–840.

GUTIÉRREZ, R. CARMONA A. Validación de los métodos de Thevenon-Roland y Verde de Leucomalaquita como pruebas presuntivas en la investigación de sangre en manchas y fluidos. IBF. Pereira 2004.

INMLyCF. DRIP – Estadísticas. 2007, 2008. <http://www.medicinalegal.gov.co>

JAKOVICH CATHY. STR Analysis Following Latent Blood Detection by Luminol, Fluorescein, and , BlueStar. Laboratory of San Diego, CA. Journal of Forensic Identification, FBI, 2007. Páginas: 57 (2).

L. J. BLUM 1, PHILIPPE ESPERANÇA 2 , STÉPHANIE ROCQUEFELTE. New high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. Forensic Sci. 2006. Vol. 39. No 3 pp. 81–100.

LENNTECH. Hierro, 2008. <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Fe.htm>

MANRIQUE HERNANDEZ RUBEN. Manuel de referencia para la validación de técnicas analíticas. INMLyCF. 1995. Página 7.

MANRIQUE HERNANDEZ RUBEN. Manuel de referencia para la validación de técnicas analíticas. INMLyCF. 1995. Página 7.

MR. VILLEGAS, ML. ACEVEDO, J. MIRANDA Y EA. PINTO. Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses. Cuadernos de Medicina Forense. Octubre 2005. 11(42): 267-274.

M. DAWN WATKINS MS. CLPE. CSCSA. KING C. BROWN MS. CSCSA. CFPH. BLUESTAR®. A Comparison of Visual Enhancement Chemicals for the Recovery of Possible Blood Stains at the Crime Scene. Blood Deteccion. www.bluestar-forensic.com/gb/download.php.

MUÑIZ LOZANO LUISA. Apuntes básicos para la electroquímica. Reacciones de oxido reducción. 2004.
<http://www.med.uchile.reaccionesdeoxidoreduccion.pdf>

NEGRE MUNOZ, M.C., CASTELLO PONCE, A., GIL PITARCH, P. ET AL. Bloodstains?: reliability of the presumptive test. Cuadernos de medicina forense. 2003, No. 34. <http://scielo.isciii.es/scielo.php>.

NEGRE, CASTELLO; GIL; VERDU. Influencia del ambiente en el estudio criminalístico de muestras biológicas. Revista Brasileira de Medicina Legal. Año 2004, Volumen II, No.1.

PRACTICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. Practica 8. Propiedades generales y propiedades de las enzimas: Estudio de la peroxidasa. <http://www.um.es/bbmbi/Docencia/Practicas/Medicina/PracticasLaboratorio/Practica08.htm>.

PRIETO SOLLA LOURDES. APLICACIONES FORENSES DEL ADN. Comisaría General de Policía Científica Laboratorio de ADN.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/aplicaciones_forenses_del_adn.pdf

PRIETO SOLLA LOURDES. APLICACIONES FORENSES DEL ADN. Comisaría General de Policía Científica Laboratorio de ADN.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/aplicaciones_forenses_del_adn.pdf

PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE TRABAJO PARA DETECCION DE SANGRE MEDIANTE PRUEBA PRESUNTIVA DE THEVENON-ROLAND. Código:DRC-GBF-T-PET-01 (MERCK Y ALDRICH).

RAFAEL MONGE ROJAS. Guía alimentarias para la educación nutricional, Hierro. Costa Rica. <http://netsalud.sa.cr/guiasalimentarias/hierro.pdf>

SALAS CARMONA CARLOS. Química y ciencias. 2001.
<http://www.quimicayciencias.cjb.net>

SALCEDO CIFUENTES MERCEDES, Manejo de la Evidencia Física de posible fuente Biológica, Colección Ciencias Físicas, Exactas y Naturales, programa editorial Universidad del Valle, Páginas. 52 a 55.

SHANAN S, TOBE, M.SC; NIGEL WATSON, PH.D; Y NIAMH NIC DAEID, PH.D. Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA. Forensic Sci, January 2007, Vol. 52, No. 1. www.blackwell-synergy.com

VARGAS DUEÑAS EVARISTO. Biología Forense. Fluidos del cuerpo humano. Manual de criminalística. Primera Edición. Editorial Señal Editora. 2000. Capitulo XI, Páginas 200.

VARGAS DUEÑAS EVARISTO. Biología Forense. Fluidos del cuerpo humano. Manual de criminalística. Primera Edición. Editorial Señal Editora. 2000. Capitulo XI, Páginas 203, 204.

WEBB SAMANTHA, Criminalist Saint Louis Metropolitan Police Department, Luminol vs. BlueStar®: A Comparison Study of Latent Blood Reagents.

11. GLOSARIO

- **Aminofenazona:** derivado pirazolónico, no esteroide, antiinflamatorio y analgésico. Su nombre comercial es el PIRAMIDON, se retiró del mercado pues se comprobó que era cancerígena en animales de experimentación
- **Catalasas** son enzimas peroxisómicas que, en contraste con las peroxidasas, no requieren de un substrato reductor para su actividad. Se encargan de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
- **Enzimas:** son proteínas que catalizan una gran cantidad de reacciones biológicas. Como cualquier catalizador, las enzimas aumentan la velocidad de la reacción que facilitan, pero no afectan la constante de equilibrio de ésta. Su acción se produce por una disminución en la energía de activación de las sustancias reaccionantes. Por su naturaleza proteínica, y a diferencia de otros catalizadores inorgánicos, las enzimas son sensibles a condiciones extremas de pH, temperatura, etc., y catalizan las reacciones biológicas en condiciones suaves, semejantes a las que se encuentran en las células, fluidos biológicos etc.
- **Hemoglobina:** Es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 68.000, de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos. La forman cuatro cadenas polipeptídicas (globina) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno.
- **Peroxidasas:** ferro enzima que cataliza la oxidación de una serie de sustancias aromáticas (fenoles, aminas aromáticas, ácidos aromáticos) y sus compuestos (nitritos). Se encuentran principalmente en la leche, la

saliva y los leucocitos. Están bien distribuidas en bacterias aeróbicas, plantas y animales, pueden usar una amplia gama de sustratos.

- **Especificidad:** Es la capacidad de un método diagnóstico para detectar como positivas aquellas muestras que realmente poseen el analito en estudio.
- **Índice de concordancia (PC):** Valor que permite establecer la incidencia del azar en dos series de mediciones practicadas por personas diferentes sobre eventos semejantes.
- **Índice de Kappa:** Es otra forma de medir la Reproducibilidad de las mediciones realizadas por dos analistas diferentes sobre una misma muestra en condiciones semejantes y se emplea cuando se desea corregir la concordancia obtenida como consecuencia del azar, razón por la cual puede ser más aconsejable su empleo que el Índice de Concordancia.
- **Leucobase:** El leuco del prefijo significa blanco y refiere a la pérdida de color en la solución. Sin embargo, una leucobase apropiada es producida por la reducción, y su color es restaurado por la oxidación.
- **Límite de Detección:** Es la menor concentración del analito en una muestra que puede ser detectada bajo condiciones experimentales establecidas.
- **Método:** Es una adaptación de una técnica para una medición específica con un fin determinado. Ej.: cuantificación de plomo por absorción atómica.
- **Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad):** Es la mutua concordancia entre resultados individuales alrededor de un valor medio, que no es necesariamente el valor verdadero. Es una medida del grado de

reproducibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- **Pruebas de orientación:** Técnicas que revelan la posible naturaleza de la mancha pero no nos la aseguran, es decir, sirven sólo para descartar, pero no para concluir.
- **Quimioluminiscencia:** Se entiende el fenómeno que en algunas Reacciones químicas la energía liberada no sólo se emite en forma de calor o de energía química sino en forma de luz.
- **Repetibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados de mediciones o ensayos sucesivos de una misma característica, obtenidos con el mismo m, todo, por el mismo observador, con los mismos instrumentos de medida o ensayo, en el mismo laboratorio y a intervalos de tiempo suficientemente cortos.
- **Reproducibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados aislados de una medición de una misma magnitud o del ensayo de una misma característica y obtenidos con el mismo m, todo pero en condiciones diferentes; por ejemplo, con diferentes instrumentos de medida, por diferentes observadores, en diferentes laboratorios, a intervalos de tiempo suficientemente grandes comparados con la duración de una medición, en diferentes condiciones de empleo de los instrumentos de medida, etc.
- **Sensibilidad:** Es la capacidad de un método diagnóstico para detectar como negativas aquellas muestras que realmente no poseen el analito en estudio.

- **Técnica:** Es la aplicación de un principio científico del cual se ha demostrado su utilidad para proveer información analítica. Ej.: absorción atómica.
- **Valor Predictivo Positivo (VPP):** Es la probabilidad de que una muestra presente el analito en estudio cuando la prueba analítica puede ser positiva.
- **Valor Predictivo Negativo (VPN):** Es la probabilidad de que una muestra no presente el analito en estudio cuando la prueba analítica resulta ser negativa.
- **Validación Prospectiva:** Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico, se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico de los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.