

Validation of The Takayama Confirmatory Test for Blood Identification in Stains

Validación de la Prueba confirmativa de Takayama para identificación de sangre en manchas

N. J. Castillo-Rodríguez¹ and J. A. Cortés-Osorio²

Abstract— The identification of blood in dry spots using the Takayama crystallographic method is used to support the orientation tests in the laboratory of the National Institute of Forensic Medicine and Forensic Sciences (Colombia). This study evaluates and determines, using the crystallographic method, the sensitivity, the specificity, the positive predictive value, the negative predictive value, the detection limit, and the concordance index under the conditions of different temperatures, support, and environmental conditions for Takayama test. 100 samples of dry spots were taken to be double-blinded evaluated, on different substrates using the Takayama confirmatory method for blood identification, following the relevant biosecurity measures developed by the Forensic Biology Laboratory. The statistical values of sensitivity were 92.68%, Specificity 100%, Positive Predictive Value 100%, Negative Predictive Value 95.24%, Detection Limit 1/40 and 100% Concordance Index. The high degree of specificity reveals the effectiveness of the Takayama crystallographic method as confirmatory evidence of support for the presumptive methods of orientation in the identification of blood in spots.

Index Terms— Confirmatory test, Crystal, Forensic, Hemochromogen, Blood, Performance evaluation, Takayama.

Resumen— Se realiza el estudio de identificación de sangre en manchas secas utilizando el método cristalográfico de Takayama como apoyo a las pruebas de orientación en la labor pericial de los laboratorios Forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Colombia). Este estudio evalúa y determina, por el método cristalográfico de Takayama, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, el límite de detección y el índice de concordancia según las diferentes condiciones de temperatura, soporte y ambiente. Metodología: Se toman 100 muestras de manchas secas para ser analizadas a doble ciego, en diferentes sustratos utilizando el método confirmativo de Takayama para identificación de sangre, siguiendo las medidas de bioseguridad pertinentes por el laboratorio de biología Forense. Los valores estadísticos de calidad

arrojados en sensibilidad fueron de 92.68%, Especificidad 100%, Valor Predictivo Positivo 100%, Valor Predictivo Negativo 95.24%, Limite de Detección de 1/40 y un Índice de Concordancia del 100%. A partir de los datos obtenidos el alto grado de especificidad pone en manifiesto la efectividad del método cristalográfico de Takayama como prueba confirmativa de apoyo a los métodos presuntivos de orientación en la identificación de sangre en manchas.

Palabras claves— Cristal, Especificidad, Forense, Hemocromógeno, Prueba confirmativa, Sangre, Takayama.

I. INTRODUCCION

El estudio de manchas de sangre ha sido de gran interés en el desarrollo de las investigaciones Forenses, lo que con lleva a una permanente actualización, en nuevas técnicas de mayor efectividad y en el menor tiempo posible para ser realizadas por los Laboratorios de Biología Forense en Colombia [1] [2].

Las características físicas y los resultados de diferentes técnicas aplicadas para identificar manchas de sangre no autorizan responder con certeza si una mancha está constituida por sangre, ya que las reacciones químicas son reacciones de posibilidad, probabilidad u orientación; por esta razón se deben complementar los resultados con técnicas cristalográficas cuyas especificidades complementan la sensibilidad de pruebas de orientación obteniéndose resultados de mayor confiabilidad [1].

Funke publicó una serie de artículos en los que describía el crecimiento de los cristales de hemoglobina mediante la dilución sucesiva de glóbulos rojos con un disolvente (agua pura, alcohol o éter), seguida de la evaporación lenta del disolvente de la solución [3].

Theichman señaló la aparición de Cristales de forma rómbica cuando la sangre fue tratada con Ácido acético glacial y cloruro de sodio. Estos cristales fueron posteriormente identificados como los de hematina clorídica, y desde entonces se ha reconocido universalmente que su presencia es prueba de la

Este manuscrito fue enviado el 20 de septiembre de 2018 y aceptado el 10 de diciembre de 2018.

La investigación fue realizada con el apoyo del Instituto de Medicina Legal y ciencias Forenses, Regional Occidente, Colombia.

J.A. Cortés-Osorio es profesor titular del Departamento de Física de la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. (e-mail: jacoper@utp.edu.co).

N. Castillo-Rodríguez es profesora auxiliar del Departamento de Física de la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. (e-mail: nancycastleill@utp.edu.co).

identidad de sangre en manchas secas [4].

Takayama, mejoró la definición de los cristales propuestos por Theichman, utilizando piridina, glucosa e hidróxido de sodio. La combinación de estos reactivos en presencia de sangre da como resultado la formación de cristales de hemocromógeno [1]. Masao Takayama mejoró la definición de los cristales propuestos por Theichman, utilizando piridina, glucosa e hidróxido de sodio. La combinación de estos reactivos en presencia de sangre da como resultado la formación de cristales de hemocromógeno [1].

La prueba Confirmativa de Takayama es una técnica de cristalización basada en la existencia de cierto derivado de la hemoglobina que tiene la tendencia de cristalizar en hemocromógeno [5]. El reactivo de cristalización se compone de una base nitrogenada, generalmente la piridina, de un agente hematinizante, el hidróxido de sodio y un agente reductor la glucosa que, al colocarse en contacto con la mancha de sangre a analizar, presenta en el microscopio cristales de forma arborescente como las hojas de un pino de color naranja [6]. En la Fig.1 se evidencia la identificación de sangre por la prueba de Takayama en el microscopio.

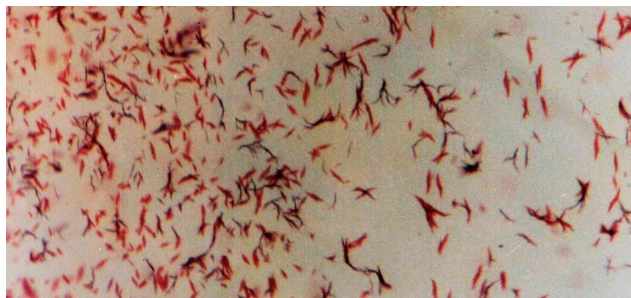


Fig 1. Identificación de sangre por la prueba de Takayama.

El fundamento químico de la prueba da origen a los cristales a partir de una hidrólisis alcalina, liberando el grupo prostético de la globina, el ion férrico Fe^{3+} , se neutraliza por el ion (OH) reduciéndose aun ion ferroso Fe^{2+} presente en el grupo hemo de la hemoglobina, el cual al unirse con un átomo de nitrógeno de la molécula de piridina genera un complejo hemocromogénico de la protoporfirina con la piridina [7].

Hematina + NaOH + Glucosa + Piridina \rightarrow Piridina Ferroprotoporfinica (cristales de Hemocromógeno). En la fig.2 se ilustra la estructura molecular de la piridina Ferroprotoporfinica.

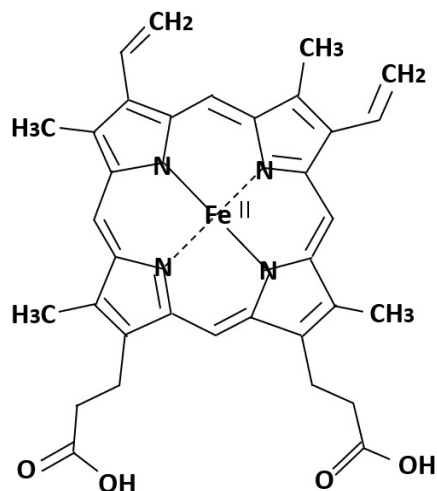


Fig. 2. Estructura molecular de la piridina Ferroprotoporfinica.

La decisión final sobre el resultado de esta prueba se debe hacer por comparación de la sustancia desconocida con una sustancia de referencia o control bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y ambiente [8].

Se han realizado varios trabajos [9] [10] [11] [12] en los cuales la prueba confirmativa de Takayama presenta su efectividad en el análisis de manchas de sangre, demostrando que en la actualidad es un método determinante para el analista forense [13] [14] [15].

Esta investigación busca validar la vigencia y límites actuales de la prueba confirmativa de Takayama para identificación de sangre en manchas secas para su uso en los laboratorios de del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Colombia).

II. METODOLOGIA

Los reactivos utilizados para la preparación del Reactivo de Takayama se elaboraron siguiendo los procedimientos de bioseguridad establecidos por el instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses [16].

A. Materiales

Algodón pretratado, telas, papel filtro, gradilla para tubos, pinzas metálicas de punta delgada, tijera recta de punta delgada, mechero de alcohol, laminas portaobjetos, laminas cubreobjetos, cinta de enmascarar, cajas de Petri (materiales para la preparación de las muestras); vasos de precipitación 100ml, probeta de 10ml, tubos de eppendorf de 1.5ml, caja pesa sustancias, puntas desechables para pipetas automáticas, espátula delgada, frascos para almacenamiento de reactivos color ámbar, pipetas automáticas, tubos de ensayo, guantes y tapabocas, bolsas de papel pequeñas, bolsas plásticas, y probeta graduada (materiales en la preparación de reactivos).

B. Equipos utilizados

TABLA I
UNIVERSO DE LAS MUESTRAS

Origen	Muestra	Tipo	Cantidad
Sangre	Sangre humana	Sangre en mancha	17
		diluciones de la sangre líquida	9
Sangre	Sangre animal	Animales, animal domestico	15
Fluidos corporales humanos (biológicos)	leche materna, saliva, sudor, orina, semen humano, materia fecal humana	humano	12
Productos Vegetales	Verduras, frutas	plantas	29
Productos y Reactivos químicos	detergente polvo, detergente líquido, hipoclorito, lugol, isodine, marcador rojo, salsa de tomate, tiocianato de cobalto, vino rojo	químico	18

Cámara de extracción de gases, nevera (5°C +/- 3°C), destilador de agua, cronometro, balanza analítica, microscopio, horno con recirculación de aire, pipetas semiautomáticas con embolo. (Rango de 10ul, 200ul, 1000ul), termohigrómetro, y vortex. (Utilizados en la preparación de reactivos, muestras y en el análisis de las muestras a doble ciego).

C. Reactivos utilizados

Solución salina 0.85%, Dextrosa anhidrida 10%, Hidróxido de sodio 10%, y Piridina 99.5%

D. Método

Para el estudio se utilizaron manchas secas en diferentes sustratos. El método de análisis es una prueba confirmativa cristalográfica, para lo cual se emplearon todas las medidas de bioseguridad pertinentes por el laboratorio de Biología forense.

E. Población de estudio

Se seleccionaron 100 muestras para un estudio con codificación cruzada (muestras ya elaboradas, donde un analista asignó un código numérico a cada muestra y lo consignó en un listado; posteriormente las muestras codificadas pasaron a un segundo analista que las codificó por segunda vez y al finalizar se compararon los resultados obtenidos) entre manchas de sangre, puras y diluidas, extractos de productos

vegetales, productos químicos y fluidos biológicos de origen humano.

F. Muestras

En la Tabla 1 se presenta el universo de las muestras para su estudio.

G. Criterios de selección de muestras y sustratos

Se utilizó sangre humana como control positivo y agua salina de concentración 0.85% como control negativo, se tomaron muestras de sangre de animal doméstico y animales salvaje siguiendo los requerimientos de salubridad pertinentes. Los fluidos corporales de origen humano se seleccionaron para identificar algún tipo de reacción con el método analítico en estudio y llegar así a producir interferencias. Los productos vegetales, sus derivados y los productos químicos fueron utilizados para quitarle el sesgo al analista.

H. Sustratos y preparación de sustratos

Se emplearon sustratos como: tela garza o tela pañal pretratada debido a que no presentan porosidad y es muy absorbente; de igual forma se usó papel filtro, seda, jean, lino, nylon, franela y dacron, todos ellos de diferente color. La preparación de sustratos (mancha seca) se llevó acabo; cortando fragmentos de 0.5cm x 0.5cm adicionándole cuarenta microlitros 40ul del fluido a investigar, se pasó a secar en cabina de flujo laminar a temperatura ambiente por un tiempo de tres 3 horas, se almacenó en bolsas de papel, se rotuló y se guardó en una bolsa plástica en nevera a una temperatura de -25°C +/- 5°C.

TABLA III
DILUCIÓN EN SANGRE LÍQUIDA

Dilución	Volumen de la dilución (ul)	Más	Solución salina 0.85% (ul)
1:10	10ul sangre	+	90ul
1:20	50ul de dilución 1:10	+	50ul
1:40	50ul de dilución 1:20	+	50ul
1:80	50ul de dilución 1:40	+	50ul
1:100	10ul sangre	+	990ul
1:160	50ul de dilución 1:80	+	50ul
1:200	500ul de dilución 1:100	+	500ul

I. Preparación de Extractos

Se colocó el fragmento de la mancha preparada de 0.5cm x0.5 cm dentro de un tubo debidamente rotulado, se adicionó 100ul de solución salina 0.85%, posteriormente se tapó y se pasó a mezclar en el vortex por un tiempo de 30s a velocidad de 1500rpm (revoluciones por minuto). El almacenamiento se llevó a cabo a una temperatura de 5°C +/- 3°C en nevera por 24 horas [17].

J. Preparación de Diluciones

En la Tabla 2 se muestran las diluciones de sangre humana en mancha empleadas, desde 1:10 hasta 1:100 partiendo de un extracto de 0.5cm x 0.5 cm con 20ul de solución salina 0.85%.

TABLA II
DILUCIÓN DE SANGRE EN MANCHA

Dilución	Sustrato	Volumen de la dilución (ul)	Más	Solución salina 0.85% (ul)
1:10	Tela garza	10ul extracto de mancha	+	90ul
1:20	Tela garza	50ul de dilución 1:10	+	50ul
1:40	Tela garza	50ul de dilución 1:20	+	50ul
1:80	Tela garza	50ul de dilución 1:40	+	50ul
1:100	Tela garza	10ul extracto de mancha	+	990ul

En la tabla 3 se listan las diluciones en sangre líquida realizada a partir de sangre total anticuagulada con citrato de sodio.

K. Técnica

Para el estudio de las 100 muestras con codificación cruzada se realizó un corrido por cada 10 muestras, teniendo como control positivo sangre humana y como control negativo solución salina; se tomó una lámina portaobjeto y se adicionó 10ul de la muestra o extracto a estudiar, se pasó a secar al horno por un tiempo de 6 +/- 2 minutos a temperatura de 60°C, y posteriormente se colocó en cámara de extracción y se adicionó 20ul del reactivo de Takayama cubrimiento totalmente la muestra. Seguidamente, se realizó un pequeño contacto de la muestra con un cubreobjeto y se dejó caer lentamente sobre ella, logrando de esta manera su cubrimiento. Posteriormente, se pasó a dejar la muestra en una cámara humedad por un tiempo de 5 a 3 minutos, al cabo del cual se pasó la muestra a estudio en el microscopio para ser observada en objetivo de 10X y luego en 40X obteniendo las lecturas correspondientes.

L. Lectura de Resultados

Positivo: Formación de cristales color naranja, de forma arborescente como las hojas de pino que se entrelazan.

Negativo: Ausencia de cristales.

El análisis cualitativo y sus atributos numéricos en sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de concordancia e índice de kappa según la matriz de confusión fueron tomados siguiendo el protocolo de análisis de datos estadísticos [18]. También se mantuvieron presentes las normas de bioseguridad y limpieza

del material utilizado por el laboratorio de biología forense.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando la matriz, en la tabla 4 se observan los datos obtenidos en la prueba de Takayama.

TABLA IV
PRUEBA DE TAKAYAMA

PRUEBA	RESULTADOS	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS
Takayama	POSITIVO	38	0
	NEGATIVO	3	59

En la Tabla 5, se resume la recolección de los datos obtenidos en el método de Takayama.

TABLA V
RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE TAKAYAMA

Variable	Método de Takayama
Sensibilidad	92.68%
Especificidad	100%
Valor Predictivo positivo	100%
Valor Predictivo Negativo	95.24%
Límite de Detección	1/100 (Sangre líquida) 1/40 Sangre mancha)
Índice de Concordancia	100%
Índice de Kappa	1

El valor de kappa obtenido por los dos analistas fue de 1, lo que muestra una buena concordancia entre analistas y que no se debió al azar; como también los valores operacionales obtenidos fueron iguales para los dos analistas.

La especificidad obtenida por esta técnica, demuestra la capacidad para detectar como positivas aquellas muestras que realmente poseen el evento (o analito) en estudio, como también el grado de selectividad del método, obteniéndose un valor significativo en el análisis forense para la determinación de sangre.

La sensibilidad obtenida en la técnica de Takayama representa la probabilidad de encontrar como positivo una muestra que contenga realmente la sustancia buscada con un valor asertivo de confiabilidad para el analista forense.

El grado de concordancia realizados por los mismos analistas en el método de Takayama, con los mismos equipos de medición, en el mismo laboratorio evidenciaron que la técnica fue repetible y reproducible.

En el estudio del método de Takayama, con el propósito de evaluar sustancias o fluidos que interfirieran y lleguen a generar resultados falsos positivos, se elaboraron manchas sobre telas

de algodón en vegetales como (remolacha, repollo morado, rábano, berenjena, pimentón, uyucu, plátano verde, tomate chonto, zanahoria, flor de fique); frutas (ciruela, papaya, manzana roja, mora, zapote, uva roja); productos químicos (detergente, hipoclorito, lugol, isodine, Tiosulfato de sodio, óxido de hierro, benzal); otras sustancias como (salsa de tomate, marcador rojo, esmalte rojo y vino rojo) y fluidos biológicos humanos (leche materna, semen, heces fecales, saliva y orina) [19]. La técnica de Takayama en presencia de sustancias como el detergente y el hipoclorito arrojan resultados falso negativos debido a su acción inhibidora.

IV. CONCLUSIONES

Los datos arrojados de sensibilidad y límite de detección demuestran que la técnica actualmente queda limitada para análisis con muestras con una dilución de hasta 1:100.

Las técnicas se repitieron por ambos analistas el mismo día y días diferentes, comprobando que la técnica es repetible y reproducible, además se determinó que ni la temperatura de 25°C +/- 5°C, ni la humedad del lugar de análisis (65°C +/- 5°C), tuvieron efecto en el desarrollo del análisis.

En los distintos sustratos utilizados como (algodón, franela, jeans, lino, nylon, papel filtro, tela garza, dacrón, seda), el método de Takayama no presentó ningún tipo de interferencia ni tampoco inhibición en las reacciones cristalográficas en el momento del análisis.

Debido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la sangre se prepararon extractos tanto de controles como de muestras cada semana evitando que las proteínas presentes, sufran procesos de inactivación debido a su reactividad ya que una misma muestra puede variar su cantidad de cristales.

Aunque la técnica de Takayama presentó un alto grado de especificidad no se recomienda utilizar esta como apoyo en la marcha analítica en la investigación confirmativa de manchas de sangre debido a que la sensibilidad obtenida es muy baja comparada con los métodos colorimétricos presuntivos.

REFERENCIAS

- [1] A. N.K, "Manual Hyland de Inmunoematología revisión, concisa de principios y procedimientos," Asistencia editorial del Dr. Jhon W. Palmer, Angeles, California E.U.A.
- [2] A. Greenfield y M. Sloan, "Identificación de Fluidos Biológicos y Tinciones en La Ciencia Forense: una introducción a las Técnicas Científicas y de Investigación," EEUU: Boca Ratón, 2005.
- [3] R. E. Gaensslen, Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, Washington, DC: US Department of Justice National Institute of Justice, 1983.
- [4] Richard, Li, Modern Forensic Biology, NJ: Boca Ratón, Taylor y Francis group, pp. 93, 2002.
- [5] K. Virkler y i. K. Lednev, "Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene," Forensic Science International, vol. 188, n° 1, pp. 1-17, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>

- [6] J. n. Rodríguez, "Aportes de la hematología al campo forense: pruebas de orientación y de certeza," Revista Skopein, vol. 4, n° 13, pp. 35-36, 2016.
- [7] G. Calabuig, Medicina Legal y Toxicología, Barcelona: Masson, 2004. pp 1257. ISBN: 9788445814154
- [8] M. M. V. Silvia, "Validación del Método de Thevenon Roland Como Prueba Para Detectar la Presencia de Sangre en Manchas," Instituto de Medicina Legal de Medellín, Medellín, 2002.
- [9] V. G. Aubrey, "The use of Takayama Solution in the Identification of Blood Stains," The British Medical Journal, pp. 932-933, Mayo 21, 1932. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3724.932>
- [10] A. N. Coterhuano, Valoración de dos métodos colorimétricos para la detección de sangre en manchas secas en diferentes soportes y condiciones ambientales con fines forenses (Doctoral dissertation), Bolivia, 2009.
- [11] Vela, "Identificación Forense de Manchas de sangre por Abarcad Hematrace. Teichman y Takayama," de Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Químicas. Campus IV. XXII Jornadas científicas, México, 2014.
- [12] J. N. Rodríguez, "Aporte de la Hematología al campo forense: pruebas de orientación y de certeza," Skopein, n° 13, pp. 35-37, 2016. ISSN 2346-9307
- [13] V. Kelly y I. K. Lednev, "Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene," Forensic Science International, n° 188, pp. 5-7, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- [14] S. Sottolano y P. R. De Forest, "An improved technique for the preparation of Teichmann and Takayama crystals from blood," Microscope, vol. 28, n° 2, pp. 41-46, 1980 <https://eurekamag.com/research/004/729/004729584>
- [15] C. R. Nancy, Validación Técnica Cristalográfica Para Identificar Sangre en Diferentes Muestras Mediante El Reactivo de Takayama en el LBF Regional Occidente de Pereira, Pereira, 2004.
- [16] I. N. d. M. L. y. C. Forenses, "DRC-GBF-T-IPR-05," Pereira, 2004.
- [17] I. N. d. M. Legal, "PET sobre la determinación de la actividad de Peroxidasas," Instituto Nacional de Medicina Legal, Bogotá, 2004.
- [18] H. Manrique, Manual de Referencia para la Validación de Técnicas Analíticas. Instituto Nacional De Medicina Legal y Ciencias Forenses., Medellín, Colombia, 1995.
- [19] Simonelli, A, Felisa, "Degradación de la mancha Hemática por acción del calor", Universidad FASTA facultad de ciencias jurídicas y sociales, pp50-52, 2013. <http://redi.ufasta.edu.ar:8080/xmliui/handle/123456789/1365>



Nancy Janet Castillo-Rodríguez nació en Cali, Colombia, en 1978. Recibió los títulos de Tecnóloga Química, Química Industrial Y Magister en Instrumentación Física por la universidad Tecnológica de Pereira (UTP), Pereira, en 1997, 2008 y 2017. Actualmente Realiza sus estudios en Maestría en Enseñanza de la Física en la Universidad Tecnológica de Pereira, Desde 1998 se ha desempeñado como docente en el municipio de Pereira, Desde 2011 ha sido profesora en el Departamento de Física, UTP, y desde 2015 es profesora transitoria de medio tiempo. Sus intereses de investigación actuales incluyen proceso de tratamiento digital de imágenes en el campo de la medicina

forense, identificación de fluidos biológicos en dictámenes de carácter forense y análisis de sustancias orgánicas. Pertenece al grupo de investigación Robótica Aplicada de la UTP.



Alexander Cortés-Osorio nació en Pereira, Colombia, en 1968. Recibió los títulos en Ingeniería Eléctrica y Máster en Instrumentación Física por la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), Pereira, en 1999 y 2009, respectivamente. Actualmente desarrolla sus estudios para obtener el grado de Ph.D. en Ingeniería Automática con la Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia. Desde 2003 ha sido profesor en el Departamento de Física, UTP, y desde 2013 es Profesor Titular de Tiemplo Completo. Sus intereses de investigación actuales incluyen procesamiento de imágenes, análisis de movimiento de imágenes, visión automática, aprendizaje automático e instrumentación y medición. Cortés-Osorio es miembro afiliado de la Sociedad de Matemáticas Industriales y Aplicadas (SIAM) y del Instituto de Ingeniería Eléctrica y Electrónica (IEEE).