

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Determinación del grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" en  
manchas de sangre, Ayacucho 2015.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO

Con mención en la especialidad de Microbiología

Presentado por el:

**Bach. ALCA AYME, Igor Edicson**

AYACUCHO - PERÚ

2015

Tesis  
B704  
ALC  
Ejt

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bachiller: IGOR EDICSON, ALCA AYME


R.D. Nº 202-2015-UNSCH-FCB-D (23/09/2015)

En la ciudad de Ayacucho, siendo las seis de la tarde del día primero de octubre del dos mil quince, se reunieron los miembros del Jurado calificador MS. Elmer Ávalos Pérez como decano encargado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y miembros del Jurado calificador, Mg. Aurelio Carrasco Venegas, Blga. Ruth Huamán De La Cruz, como Miembro - Asesor, Mg. Víctor Cárdenas López como Miembro para recepcionar la sustentación de tesis: Concentración de glóbulos rojos y tiempo de reacción para la determinación del grupo sanguíneo ABO en manchas secas de sangre, Ayacucho 2014, presentado por el Bachiller en Ciencias Biológicas IGOR EDICSON ALCA AYME, para obtener el título profesional de Biólogo en la especialidad de Microbiología. En el acto estuvo presente la Mg. Edna León Palomino en calidad de Secretaria Docente. El presidente de la Comisión evaluadora inició el acto pidiendo a la Secretaria Docente de lectura a la Resolución Decanal. Luego invitó al sustentante proceda con la sustentación en un lapso no mayor de cuarenticinco minutos. Culminada la exposición, se pasó a la segunda etapa, de preguntas por la comisión evaluadora, así como solicitar aclaraciones al sustentante. El presidente de la comisión invitó participar al Mg. Víctor Cárdenas López, para que inicie con las preguntas. Manifiesta que existen errores que es necesario subsanarlas como el retirar el grupo O. Así también existen incongruencias con respecto a las dimensiones, así como la temperatura. Luego invitó al Mg. Aurelio Carrasco Venegas, quién formuló las siguientes preguntas como cuál es el contenido del abstract o resumen? ¿Qué es una investigación descriptiva? ¿Por qué considera el cuasi experimental? ¿Qué entiende por Biología? ¿Qué es la sangre? ¿Por qué manifiesta haber modificado la técnica? ¿Por qué no realizó un control de calidad? ¿Cómo potencia la albumina? Luego invitó a la Bióloga Ruth Huamán De La Cruz, para que participe como miembro Jurado y como Asesor; manifestando que realizarán las correcciones necesarias. Luego de finalizada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público en general, abandone el auditorio para las deliberaciones del Jurado evaluador que resultó como sigue:

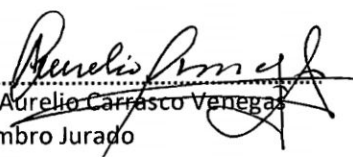
Miembros Jurados	Exposición	Rpta.a preguntas	Promedio
Mg. Aurelio Carrasco Venegas	17	17	17
Mg. Víctor Cárdenas López	16	15	16

Blga. Ruth Huamán De La Cruz	17	17	17
Promedio total			17

Obteniendo una nota aprobatoria de diecisiete (17) por unanimidad. Luego se invitó al sustentante ingresar al auditorio para comunicar el resultado, luego se procedió con la ceremonia de Juramentación y Reconocimiento como nuevo profesional Biólogo. Se acordó modificar el título del trabajo y observaciones efectuadas en la hoja de evaluación. Se dio por finalizado el acto siendo las ocho y cuarenta de la noche. Se firma al pie de la presente.



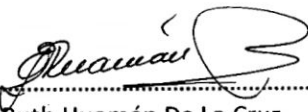
.....  
 MS. Elmer Ávalos Pérez  
 Decano(e)



.....  
 Mg. Aurelio Carrasco Venegas  
 Miembro Jurado



.....  
 Mg. Víctor Cárdenas López  
 Miembro Jurado



.....  
 Blga. Ruth Huamán De La Cruz  
 Miembro Asesora



.....  
 Mg. Edna León Palomino  
 Secretaria Docente

Con inmensa gratitud a mis padres:  
Fortunata, Eduardo y hermanos:  
Ángel, Fredy, Cluver, Carolina y  
Lionel, por el apoyo incondicional  
durante mi vida profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater* en la cultura de la humanidad, fuente de sabiduría y enseñanza, por haberme brindado mi formación profesional.

A la plana de docentes de la Escuela de Formación Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNSCH, forjadores de hombres al servicio de la sociedad, quienes con sus enseñanzas y sus conocimientos crearon mi espíritu de superación.

A la Blga. Ruth Elsa Huamán De La Cruz, asesora del presente trabajo, por su constante asesoramiento y apoyo incondicional en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Un especial reconocimiento a la Blga. Prado Calderón, Marlene. Mayor de la Policía Nacional del Perú, perito de Criminalística de la IX DIRTEPOL – Ayacucho, por guiarme en el desarrollo del presente trabajo, quien tuvo la predisposición y paciencia de absolver mis dudas e inquietudes.

Expreso mi gratitud al Blgo. Reynan Cóndor Alarcón, quien con su apoyo se logró los demás objetivos propuestos en esta investigación. A mis compañeros Merilly, Geremías y Evelin, por sus colaboraciones durante el proceso de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Criminalística	4
2.3. Biología forense	4
2.4. Hematología forense	4
2.4.1. Mancha	4
2.4.2. Mancha de sangre humana	5
2.5. Sangre	5
2.5.1. Composición de la sangre	5
2.6. Investigación en sangre seca	6
2.6.1. Proyección	6
2.6.2. Escurrimiento	6
2.6.3. Contacto	7
2.6.4. Limpiadura	7
2.7. Inmunología eritrocitaria	7
2.7.1. Antígeno	7
2.7.2. Anticuerpo	7
2.7.3. Reacciones antígeno – anticuerpo	7
a. Especificidad	7
b. Reversibilidad	7
2.7.4. Antígenos de los grupos sanguíneos	7
2.8. Aspectos bioquímicos del grupo sanguíneo ABO	8
2.8.1. Factores que afectan la aglutinación eritrocitaria	9
A. Primera etapa: Sensibilización	9
a.1. Uniones químicas	9
a.2. Constante de equilibrio de los anticuerpos	10
a.3. Temperatura	10
a.4. pH	10

a.5. Tiempo de incubación	11
a.6. Potencia iónica	11
a.7. Proporción antígeno - anticuerpo	11
B. Segunda etapa: Aglutinación	11
2.9. Importancia de la albúmina bovina	12
2.10. El método adsorción y elución	12
2.11. El método adsorción e inhibición	13
2.12. Fundamento de la técnica adsorción - elución	13
2.13. Fundamento de la técnica adsorción - elución modificado	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Localización de zona de estudios	17
3.2. Muestra	17
3.2.1. Sistema de muestreo	17
3.2.2. Características de la muestra	17
3.3. Fase pre-analítica	17
3.2.1. Desinfección del área de trabajo	17
3.2.2. Preparación de la muestra	17
3.3. Fase analítica	18
3.3.1. Técnica de absorción – elución	18
3.3.2. Técnica de adsorción – elución modificado	18
a. Determinación del título de isoglutininas de anticuerpos	18
b. Determinación del grupo sanguíneo ABO en manchas	19
3.4. Fase post-analítico	20
3.4.1. Interpretación de resultados	20
a. Técnica de adsorción - elución	20
b. Técnica de adsorción - elución modificado	20
3.5. Recolección de datos	20
3.6. Diseño de investigación	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	30
VII. RECOMENDACIONES	31
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	34

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "A") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución. Ayacucho, 2015.	25
Tabla 2. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "B") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución. Ayacucho, 2015.	26
Tabla 3. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "AB") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución. Ayacucho, 2015.	27
Tabla 4. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "A") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución modificados. Ayacucho, 2015.	28
Tabla 5. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "B") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución modificados. Ayacucho, 2015.	29
Tabla 6. Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (grupo sanguíneo "AB") diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de Adsorción - elución modificados. Ayacucho, 2015.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. La galactosa añadida a la Gal subterminal confiere actividad B; la GalNAc agregada a la Gal subterminal confiere actividad A. si no existe fucosa, que termina actividad H, fijada al carbono 2, la galactosa no acepta glúcidos en el carbohidrato 3.	6
Figura 2. Representación esquemática de los antígenos de la membrana eritrocitaria, que muestra la glucosilación de las proteínas y los lípidos. GPI = glucofosfatidilinositol.	7
Figura 3. Fenómeno de aglutinación.	10
Figura 4. Fundamento de la técnica de Adsorción-elución, y el fenómeno de elución mediante el rompimientos de los enlaces puente de hidrógeno, mediante temperatura elevada.	12
Figura 5. Fundamento de la técnica de adsorción – elución modificado, y el fenómeno de inhibición de los anticuerpos.	14

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción – elución, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo “A”, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo “A”.	33
ANEXO 2. (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción – elución, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo “B”, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo “B”.	34
ANEXO 3. (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción – elución, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo “AB”, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo “AB”.	35
ANEXO 4. (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción - elución modificado, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo “A”, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo “A”.	36
ANEXO 5. (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción - elución modificado, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo “B”, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo “B”.	37
ANEXO 6. Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – Técnica de Adsorción - elución modificado, software	38

	estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - grupo sanguíneo "AB", (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "AB".	
Anexo 7.	Título de isoaglutininas de antisueros monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B, Ayacucho, 2015.	39
Anexo 8.	(a) Tela de algodón color blanco, (b) Recorte de la tela en dimensión 5 x 5 cm, (c) Preparación de hematíes en concentraciones diluidas, (d) Manchado por goteo en las telas de algodón con 15 - 16 gotas en cada trozo.	40
Anexo 9.	(a) y (b) Tela manchadas con sangre a diferentes concentraciones y secado a temperatura por 24 horas, (c) Etiquetar en sobres de plástico con cierre hermético, (d) almacenar las manchas secas en una cámara oscura para evitar el contacto de la luz.	41
Anexo 10.	Observaciones macroscópicas y microscópicas de aglutinaciones y su reporte en cruces.	42
Anexo 11.	(a) Preparación de antisueros monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B, en diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128; técnica de Adsorción-elución modificado. (b) Tubos con antisueros diluidos enfrentados con hematíes al 2%, (c), (d) y (e) Formación del botón de hematíes luego de la centrifugación a 2500 rpm por 3 minutos.	43
Anexo 12.	(a) Diluciones de la sangre a diferentes concentraciones. (b) Toma de muestra en la escena del crimen.	44
Anexo 13.	Protocolo del procedimiento con la técnica de adsorción – elución	45
Anexo 14.	Protocolo del procedimiento con la técnica de adsorción - elución modificado.	46
Anexo 15.	Protocolo del título de isoaglutininas de los anticuerpos monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B.	47
Anexo 16.	Preparación de reactivos y cálculos de las diluciones.	48
Anexo 17.	Matriz de consistencia	50

## RESUMEN

El principal problema en que se enfrenta el investigador forense durante la toma de muestra de manchas de sangre en la escena del delito, es el recojo escaso de la muestra y la antigüedad de la mancha de sangre, siendo vitales conocer la cantidad y el tiempo de exposición, en ambientes cerrados, de la muestra hemática para obtener un certero resultado durante el procesamiento de la muestra en el laboratorio de biología forense. El presente trabajo de investigación, se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la EFP de Biología - Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses del diciembre 2014 hasta abril de 2015, tuvo como objetivo evaluar la concentración de sangre y la antigüedad de la mancha de sanguínea que permita determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB". El diseño de investigación es cuasi-experimental - transversal. En la investigación se utilizó dos técnicas forenses basados en el principio de adsorción-elución, para tipificar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", en soporte de tela de algodón manchadas con sangre del grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", a diferentes concentraciones (1%, 2%, 5%, 10%, 25% y 50%), evaluando los mismos soportes de telas cada dos días, durante 60 días. La técnica de **Adsorción-elución**, tuvo como resultado aglutinaciones en las concentraciones de 10% y 25% en telas manchadas con sangre del grupo "A", "B", "AB"; mientras que la técnica de **Adsorción-elución modificado**, tuvo como resultado ausencia de aglutinación en la concentración 50% en tela manchada con sangre del grupo "A", (considerando la ausencia de aglutinación como positivo), la mancha de sangre del grupo "B" fue 25%, en la mancha de sangre del tipo "AB" no posee una concentración óptima. Para ambas técnicas no existe un tiempo de antigüedad de las manchas óptimas, ya que los resultados se mantienen considerablemente constantes durante los 60 días.

**Palabras clave:** Hematología forense, manchas, concentración, antígeno, anticuerpo, aglutinación, adsorción - elución, albúmina bovina, isoaglutininas.

## I. INTRODUCCIÓN

Las manchas encontradas en la escena del crimen se han constituido como elemento esencial en la resolución de investigaciones judiciales. Establecer su origen y grupo sanguíneo aporta información útil en el proceso de inclusión o exclusión de sospechosos o víctimas<sup>1</sup>.

Para efectuar la individualización de personas se emplean métodos diversos. Todos son importantes, y no obstante unos sean más efectivos que otros, al aportar datos más infalibles, ninguno debe descartarse, pues en ocasiones el resultado de una identificación plena obedece al uso vinculado de varios de estos métodos<sup>2</sup>.

En muestras de sangre fresca, el problema es más simple ya que se reduce a evidenciar la presencia de los antígenos de los eritrocitos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos. En manchas de sangre seca, las células se han roto (hemólisis) y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son viables; sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente debido a la sequedad y sobreviven por algún tiempo, conservando la capacidad de aglutinación antes mencionada. La formación de la reacción antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas de las manchas de sangre seca<sup>2</sup>. Entre las técnicas más utilizadas están las de Luminol, Fenolftaleína y Piramidón, como indicadoras de la existencia de sangre, Takayama para confirmar su presencia, Inhibición de la Aglutinación para comprobar si la sangre es humana y Absorción-Elución para determinar el grupo ABO de la muestra<sup>3</sup>.

### 1.1. Objetivo general

Evaluar la concentración de sangre y la antigüedad de la mancha de sangre, óptimas que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", utilizando dos técnicas forenses.

## **1.2. Objetivos específicos**

- Conocer las concentraciones de sangre óptimas, que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" en telas manchadas de sangre, utilizando dos técnicas forenses.
- Conocer la antigüedad de mancha de sangre en telas, que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", utilizando dos técnicas forenses.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Franco<sup>4</sup>. 2002, En 1901, Landsteiner descubrió la existencia del sistema ABO, al observar que la sangre humana tenía características individuales que se manifestaba por reacciones de aglutinación, pues encontró que los eritrocitos o glóbulos rojos de unas personas eran aglutinados o agrupados por el suero sanguíneo de solamente algunos otros individuos.

Franco<sup>4</sup>. 2002, El mismo Landsteiner, en colaboración con Miller, aporta el método clásico de absorción para la determinación del grupo sanguíneo del sistema A, B, O, en manchas de sangre seca en 1925, método que es descrito por Wiener con el nombre de técnica de absorción-Inhibición y utilizado tanto para el sistema A, B, O, como para los Antígenos Eritrocitarios M, N, descubierto en el año 1927 también por Landsteiner.

Franco<sup>4</sup>. 2002, En 1960, Kind introduce el método de Absorción-Elución que viene a abolir el tradicional de Absorción-Inhibición para determinaciones de los grupos A, B, O. Nichols y Pereira en 1962, reportan su uso tanto para el sistema A, B, O, como para el M, N. Lincholin en 1968 y Dodd efectúan experiencias con técnicas de elución para la detección de los antígenos del sistema Rh.

Cacarico<sup>5</sup>. 2003, en su trabajo señala que el estudio de los aspectos físicos, químicos y serológicos de las manchas de sangre pueden llevar a conseguir demostrar uno o más de los siguientes aspectos: La participación de personas y objetos en una acción criminal: aproxima a la forma en que se llevó a cabo un determinado suceso; identificar un cuerpo desconocido; determinar, por análisis toxicológico, la causa de una muerte; finalmente, en otros, saber si se trata de una muerte por homicidio, suicidio, accidente o por causas naturales.

López<sup>6</sup>. 2003 en su trabajo señala que para el análisis de manchas de sangre, enfocadas en el área de criminología, la caracterización de las mismas se basa en la determinación del tipo sanguíneo, donde los científicos forenses determinan

primero si tienen una adecuada calidad de y si es sangre. Para su preservación las muestras se pueden dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol, hasta tiempos determinados. La buena recolección y preservación de muestras de manchas de sangre es importante, para su buena caracterización.

## **2.2. Criminalística**

Disciplina auxiliar del derecho penal que se ocupa del descubrimiento y verificación científica del delito y del delincuente. Al incluir a la criminalística en el grupo de las ciencias forenses se le da la calidad científica que se requiere en el mundo de hoy a toda investigación de un presunto hecho delictivo, ya que se menciona que utilizará todos sus conocimientos y métodos; es decir, la aplicación de todas las experiencias aprendidas de otras ciencias, así como los procedimientos que se siguen para hallar la verdad y enseñarla, coadyuvando con esto de manera científica en la administración de justicia, colaborando con la aportación de elementos científicos en la procuración e impartición de justicia.<sup>7</sup>

## **2.3. Biología Forense**

Análisis e interpretación de las evidencias como sangre, semen u otros fluidos corporales en la escena de un delito para resolver problemas judiciales y forenses así como las pruebas de paternidad que determinen en última instancia la participación de los implicados o el parentesco familiar<sup>8</sup>.

## **2.4. Hematología forense**

Es el estudio de la morfología, serología y bioquímica de la sangre aplicando a la criminalística, la hematología forense nos ayuda en la administración de justicia tanto en el aspecto identificador como reconstructor de la escena de un hecho delictivo<sup>9</sup>.

La sangre, con todas las propiedades que hemos visto constituye la mayor evidencia biológica en una escena de crimen que nos permite reconstruir prácticamente un hecho violento aportándonos información detallada de cosas muy específicas<sup>10</sup>.

La búsqueda de las manchas hemáticas debe hacerse en el escenario del crimen, revisando minuciosamente todas las superficies y los objetos que en el que se encuentren. Las manchas pueden hallarse en la víctima en el piso, paredes, sobre alfombras o debajo de estas, en cortinas, armas, etc<sup>11</sup>.

### **2.4.1. Mancha**

Por mancha se entienda toda modificación de color, toda suciedad, toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre

instrumentos, o sobre un objeto cualquiera del cuerpo humano, determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo<sup>12</sup>.

#### **2.4.2. Mancha de sangre humana**

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 mancha<sup>13</sup>.

Los patrones de la mancha de sangre habla mucho de la posición y del movimiento durante el crimen, qué sucedió primero, de qué manera, y cuántas veces. El aspecto de la mancha de sangre varía con la antigüedad, cantidad y el soporte sobre el que recaen. En los tejidos absorbentes y claros las manchas recientes presentan un color rojo oscuro, que con el tiempo tiende a ennegrecer más. Si las manchas han sido lavadas con agua, el color se hace rosa y el pigmento difunde al tejido, si bien de un modo irregular, con los lugares más densos que otros. El aspecto de la mancha, como de haber sido lavada, debe poner en guardia al perito, porque las lejías y los ácidos modifican las características estructurales de los componentes de las manchas dando lugar a causas de error en la investigación<sup>13</sup>.

### **2.5. Sangre**

La sangre es un tejido líquido que recorre el organismo, a través de los vasos sanguíneos, transportando células y todos los elementos necesarios para realizar sus funciones vitales. La cantidad de sangre está en relación con la edad, el peso, sexo y altura. Un adulto tiene entre 4,5 y 6 litros de sangre, el 7% de su peso<sup>14</sup>.

#### **2.5.1. Composición de la sangre**

La sangre está formada por un líquido amarillento denominado plasma, en el que se encuentran en suspensión millones de células que suponen cerca del 45% del volumen de sangre total. Una gran parte del plasma es agua con el 91%. La sangre humana contiene unos corpúsculos o glóbulos rojos, llamados eritrocitos o hematíes; los glóbulos blancos que reciben el nombre de leucocitos: y las plaquetas llamadas trombocitos. La sangre transporta muchas sales y sustancias orgánicas disueltas<sup>14</sup>.

La sangre tiene una densidad relativa que oscila entre 1.056 y 1.066. En el adulto sano el volumen de la sangre es una onceava parte del peso corporal, de 4.5 a 6

litros. El pH de la sangre es aproximadamente de 7 a 7.5. El bióxido de carbono reacciona con el agua para formar un ácido carbónico.  $H_2CO_3$ , por lo que el incremento de la concentración de bióxido de carbono aumenta la acidez de la sangre, lo que a su vez hace disminuir la capacidad de la hemoglobina para acarrear el oxígeno, el aumento de bióxido de carbono acidifica la sangre y la capacidad de la hemoglobina de llevar el oxígeno disminuye en una solución ácida<sup>14</sup>.

## **2.6. Investigación en sangre seca**

El objetivo final en Biología Criminalística, en cuanto a sangre se refiere, es tipificar la mancha e identificar la fuente de origen; de ahí la importancia de analizar la mayor cantidad posible de antígenos, que permitan arribar a conclusiones precisas. Estas determinaciones están limitadas por algunos efectos propios del hecho o de la fragilidad de la huella hemática, tales como: poco material disponible, carácter de irrepitibilidad, interferencia del soporte, antigüedad de la mácula, presencia de contaminantes y factores ambientales<sup>14</sup>.

Por otra parte, los efectos ambientales, fundamentalmente el medio húmedo, facilitan el crecimiento de microorganismos que actúan como contaminantes, llegando a producirse, durante el diagnóstico del grupo sanguíneo, falsas aglutinaciones por expresión predominante del antígeno de los microorganismos. Atendiendo a que en las condiciones de la sangre seca, los hematíes están destruidos y no es posible visualizar las reacciones antígeno-anticuerpo por el fenómeno de aglutinación, es necesario aplicar métodos indirectos<sup>14</sup>.

En sangre seca, al realizar los estudios de individualidad, debe preverse, en lo posible, que se tomen áreas maculadas próximas a la zona de mayor intensidad (costras); y desecharlas, si se pudiera, al considerar que durante el proceso de secado los componentes del plasma tienden a quedar hacia las áreas exteriores de la mácula, concentrándose en el centro, según su densidad, los estromas eritrocitarios<sup>14</sup>.

Otro aspecto a considerar en la investigación de las máculas, es la detección del mecanismo que motivó su formación. Se pueden distinguir los siguientes mecanismos<sup>15</sup>:

**2.6.1. Proyección:** Cuando la sangre sale proyectada con cierta fuerza, bien describiendo una curva parabólica o en caída libre<sup>14</sup>.

**2.6.2. Escurrimiento:** La sangre, por determinada concentración, forma regueros o charcos, al ir cayendo por la acción de la gravedad<sup>14</sup>.

**2.6.3. Contacto:** Cualquier objeto ensangrentado deja una impresión al contactar con un receptor. En los casos de mayor concentración se le denomina impregnación<sup>14</sup>.

**2.6.4. Limpiadura:** Es un mecanismo mixto de contacto e impregnación. En ella generalmente decrece la intensidad del color hacia uno u otro sentido<sup>14</sup>.

## **2.7. Inmunología eritrocitaria**

### **2.7.1. Antígeno**

El antígeno puede ser definido como una sustancia que, introducida parentalmente en un individuo, es capaz de estimular la producción de un anticuerpo, el cual reaccionará con el antígeno que lo estimuló<sup>15</sup>.

### **2.7.2. Anticuerpo**

Los anticuerpos son proteínas que se refieren a una u otra clase de inmunoglobulinas, cuya síntesis se estimula después de la entrada parenteral del antígeno. Los anticuerpos o aglutininas poseen la capacidad de interreaccionar específicamente con el antígeno dado, lo cual se debe a los dominios presentes en cada molécula de anticuerpo<sup>15</sup>.

### **2.7.3. Reacciones antígeno – anticuerpo**

Las reacciones de la interacción específica de los anticuerpos séricos con los antígenos, contra los cuales están dirigidos, son fenómenos de superficie que no alteran la estructura primaria de las moléculas involucradas, y tienen como característica<sup>15</sup>:

#### **a. Especificidad**

El anticuerpo puede fijarse únicamente con el antígeno de procedencia. Este concepto se aplica a la detección de todos los sistemas de grupo sanguíneo, ya que las reacciones pueden ocurrir *in vivo* o *in vitro*, mediante la adsorción. Es el denominado principio *llave-cerradura*<sup>15</sup>.

#### **b. Reversibilidad**

Esta reacción antígeno-anticuerpo, constituye una reacción de equilibrio sometida a la ley general de acción de masas, siendo necesario para el desplazamiento del equilibrio, ciertas condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura, lo que posibilita la separación del anticuerpo, de su antígeno. Este proceso es conocido como elución<sup>15</sup>.

### **2.7.4. Antígenos de los grupos sanguíneos**

Las membranas de las células del organismo humano incluyendo los eritrocitos están formadas por varias capas de moléculas lipídicas, proteicas y carbohidratos

distribuidos en tal forma que permiten una separación entre el medio intracelular y el medio extracelular<sup>15</sup>.

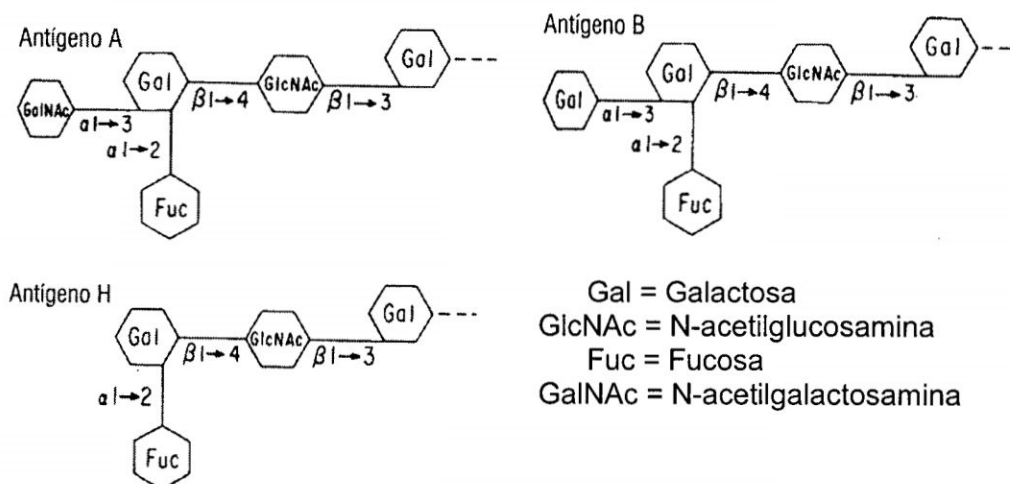
Los carbohidratos se encuentran formando oligosacáridos y polisacáridos que en su mayor parte están ligados a lípidos y proteínas<sup>16</sup>.

Muchas de estas sustancias, es decir, glicolípidos y glicoproteínas tienen capacidad antigénica y constituyen los llamados grupos sanguíneos<sup>16</sup>.

Estos antígenos pueden formar parte de la membrana del glóbulo rojo como ser el antígeno Rh que es una lipoproteína o estar adherido a la superficie de los glóbulos rojos, como los antígenos ABO que químicamente son lipopolisacáridos. Algunos antígenos sanguíneos (Ej. ABO) están presentes en la mayoría de los tejidos y líquidos corporales y otros como el Rh, K, etc. Limitados y formando parte de las membranas de los glóbulos rojos<sup>16</sup>.

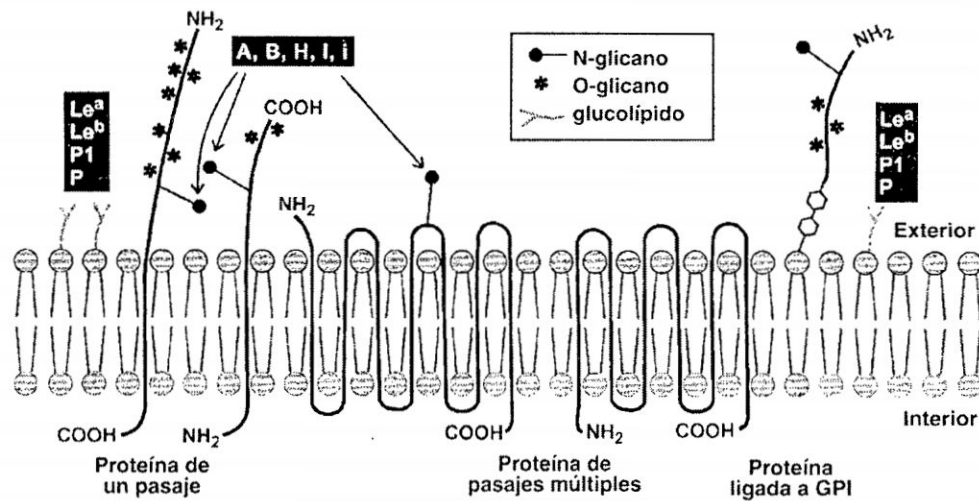
## 2.8. Aspecto bioquímico del grupo sanguíneo ABO

Los glóbulos rojos de las personas del grupo "O" carecen de antígenos A y B, pero poseen antígenos H, la sustancia precursora de A y B. Las cadenas de carbohidratos que llevan antígenos ABH pueden ser ligados a moléculas transportadoras de proteínas (glicoproteína), esfingolípidos (glicoesfingolípidos), o lípidos (glucolípidos). Las glicoproteínas o glicoesfingolípidos que transportan los antígenos A y B son parte integral de las membranas de los glóbulos rojos, células epiteliales y endoteliales y también están presente en el plasma, en forma soluble<sup>17</sup>.



**Figura N° 01:** La galactosa añadida a la Gal subterminal confiere actividad B; la GalNAc agregada a la Gal subterminal confiere actividad A. si no existe fucosa, que termina actividad H, fijada al carbono 2, la galactosa no acepta glúcidos en el carbohidrato 3<sup>17</sup>.

Los antígenos A, B y H se constituyen en cadenas de carbohidratos, que difieren en la ligadura y composición del disacárido terminal; existen por lo menos seis de estos tipos de ligaduras disacáridos. Las cadenas tipo 1 difieren de las de tipo 2 en la ligadura de la Gal terminal al disacárido GlcNAc. Las estructuras de Tipo 1, A, B y H se detectan en secreciones, plasma y tejidos derivados del endodermo. No son sintetizadas por los glóbulos rojos pero se incorporan en la membrana eritrocitaria desde el plasma<sup>17</sup>.



**Figura N° 02:** Representación esquemática de los antígenos de la membrana eritrocitaria, que muestra la glucosilación de las proteínas y los lípidos. GPI = glucosilfosfatidilinositol.<sup>17</sup>

### 2.8.1. Factores que afectan la aglutinación eritrocitaria

La aglutinación es una reacción química reversible que se desarrolla en dos etapas:

#### A. Primera etapa - sensibilización

Antes de la unión, los antígenos y anticuerpos deben encontrarse y crear un nexo espacial apropiado. La posibilidad de asociación puede incrementarse por agitación, centrifugación o variación de la concentración relativa de anticuerpos y antígenos<sup>17</sup>.

La sensibilización requiere el establecimiento de puentes químicos no covalentes entre los antígenos y anticuerpos. Las fuerzas de unión suelen ser débiles (en comparación con los puentes covalentes intermoleculares) y sólo actúan a muy corta distancia. La combinación antígeno-anticuerpo es reversible y los puentes o uniones se crean y rompen de manera constante hasta alcanzar el equilibrio<sup>17</sup>.

#### a.1. Uniones químicas

Diferentes tipo de uniones químicas son responsables de la fijación de anticuerpos a antígenos, como los puentes de hidrógeno, las uniones hidrófobas, las uniones

electrostáticas o iónicas y las fuerzas van der Waals. Estos tipos de uniones químicas son relevantes en la inmunohematología, porque los diferentes tipos de uniones tienen diferentes características termodinámicas; pueden ser exotérmicas o endotérmicas. A su vez, las características termodinámicas pueden afectar los fenómenos serológicos que se observan en las pruebas. Por ejemplo, los antígenos de tipo carbohidratos suelen formar puentes de hidrógeno exotérmicos con los sitios de combinación de los anticuerpos resultando en puentes que son más fuertes a temperaturas bajas. En contraste, los puentes hidrófilos que se forman con antígenos proteicos son endotérmicos y son más fuertes a temperaturas más altas<sup>17</sup>.

#### **a.2. Constante de equilibrio (afinidad $K_0$ ) de los anticuerpos**

Está determinada por las tasas relativas de asociación y disociación. La  $K_0$  varía de acuerdo a cada reacción antígeno-anticuerpo. Esta constante refleja el grado de asociación y unión mutua del antígeno y el anticuerpo (valor de ajuste) y la velocidad de la reacción. Cuanto más alto es el valor de  $K_0$  mayor es la asociación o "ajuste". Cuando el valor de  $K_0$  es grande, la reacción es más rápida y la disociación es más difícil; estos anticuerpos podrían tener mayor relevancia clínica. Cuando  $K$  es reducida, la detección puede requerir una tasa de anticuerpos más elevada con respecto a la de antígenos<sup>17</sup>.

#### **a.3. Temperatura**

La mayoría de los anticuerpos de grupo sanguíneo reacciona en rangos térmicos restringidos. La temperatura óptima antígeno-anticuerpo se vincula más con el tipo de reacción y la naturaleza química de los antígenos, que con la clase de anticuerpos. Estos anticuerpos se dividen en dos grandes categorías: los reactivos en frío (por ejemplo, 4-25°C) y los reactivos en caliente (por ejemplo 30-37°C). Los antígenos de tipo carbohidratos suelen relacionarse con anticuerpos "reactivos en frío" y los proteicos con anticuerpos "reactivos en caliente"<sup>17</sup>.

#### **a.4. pH**

Las modificaciones de pH pueden afectar las uniones electrostáticas. Se desconoce el pH óptimo de la mayoría de los anticuerpos de grupo sanguíneo significativos, pero se supone que se aproxima al rango fisiológico. Ciertos anticuerpos ocasionales, en particular algunos anti M, reaccionan más a pH bajo. En la mayoría de las pruebas de rutina debe emplearse un pH de alrededor de 7. La solución salina almacenada tiene un pH de 5-6. La solución salina amortiguada es una alternativa y puede ser útil especialmente para los estudios en fase sólida.<sup>17</sup>

### **a.5. Tiempo de incubación**

El intervalo necesario para alcanzar el equilibrio depende del anticuerpo de grupo sanguíneo del que se trate. Las variables significativas incluyen requerimientos térmicos, clase de inmunoglobulina e interacciones específicas entre la configuración antigénica y el sitio Fab de los anticuerpos el agregado de agentes potenciadores al sistema puede abreviar el intervalo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio<sup>17</sup>.

En los sistemas salinos que utilizan suero antiglobulínico para demostrar la fijación del anticuerpo, la incubación a 37°C durante 30 – 60 minutos permite detectar la mayoría de los anticuerpos significativos. En el caso de algunos anticuerpos débilmente reactivos, la asociación podría no alcanzar el equilibrio en 30 minutos y la prolongación de la incubación podría incrementar la sensibilidad de la prueba. La extensión más allá inconvenientes, excepto la demora en la obtención de los resultados<sup>17</sup>.

### **a.6. Potencia iónica**

En la solución salina normal, los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se agrupan y neutralizan en parte las cargas opuestas de las moléculas de antígenos y anticuerpos. Este fenómeno impide su asociación. No obstante, si se disminuye la potencia iónica del medio, el efecto protector se debilita y la atracción electrostática aumenta. La reducción de la concentración salina del sistema suero-células acrecienta la tasa de aproximación de los antígenos y anticuerpos y podría incrementar la cantidad de anticuerpos unidos<sup>17</sup>.

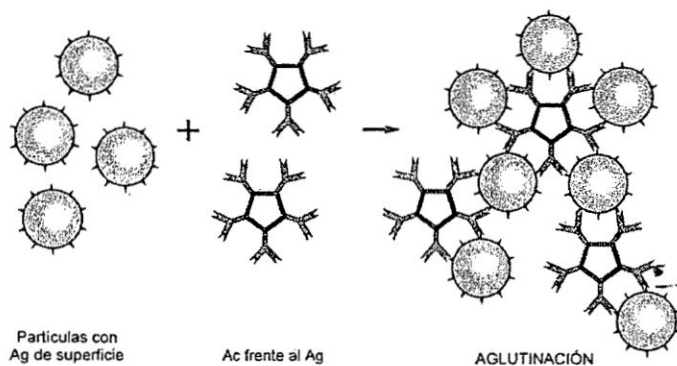
### **a.7. Proporción antígeno-anticuerpo**

El exceso de antígenos en relación con los anticuerpos podría resultar en una captación óptima de los anticuerpos. En las pruebas de inhibición o adsorción, esta circunstancia es útil. Sin embargo en la mayoría de los estudios eritrocitarios el exceso de antígenos reduce el número de moléculas de anticuerpo unidas por glóbulo rojo, limitando su capacidad de aglutinación. Por lo tanto en la mayoría de los procedimientos de rutina es preferible contar con anticuerpos en exceso<sup>17</sup>.

## **B. Segunda etapa - aglutinación**

Una vez que los anticuerpos se han unido a los antígenos de la superficie eritrocitaria, las células sensibilizadas se conforman en una red o malla. Este hecho permite visualizar la reacción. El tamaño y las propiedades físicas de las moléculas de anticuerpo, la concentración de los sitios antigénicos en cada célula y la distancia entre las células, afectan la aglutinación<sup>17</sup>.

Los puentes establecidos entre los anticuerpos ligados a los sitios antigénicos de glóbulos rojos adyacentes suelen resultar de la colisión al azar de las células sensibilizadas. En condiciones isotónicas, los glóbulos rojos no pueden aproximarse a menos de 50 – 100 Å<sup>17</sup>.



**Figura N° 03:** Fenómeno de aglutinación<sup>18</sup>

### 2.9. Importancia de la albumina bovina

La Albúmina Bovina, es un reactivo complementario a las técnicas inmunohematológicas diversas para potenciar la reacción entre anticuerpos de clase IgG y sus antígenos correspondientes. La albúmina actúa disminuyendo el potencial zeta y aumentando la constante dieléctrica del medio, con lo cual la fuerza de repulsión entre hematíes se reduce facilitando su aglutinación. La albúmina bovina tiene muchas aplicaciones como en la detección de anticuerpos irregulares, pruebas de compatibilidad, identificación y titulación de anticuerpo (determina la tasa de anticuerpos resultante del embarazo y/o de reacciones transfusionales) y tipaje de antígenos. También usados en procedimientos bioquímicos como ELISA, Western Blot y como nutriente en cultivos celulares<sup>19</sup>.

### 2.10. El método adsorción y elución

En el cual se mezclan a los sueros anti-A y anti-B (eventualmente también anti-H) las muestras que se deben analizar, cuyos aglutinógenos absorben entonces, como en el método precedente, las aglutininas de los sueros. Pero esta vez, el excedente eventual de aglutininas es eliminado, mientras que las aglutininas absorbidas se extraen mediante un procedimiento adecuado y se tratan con una suspensión de glóbulos rojos conocidos. También aquí, se identifica el grupo de la muestra observando si hay o no aglutinación. Pero, contrariamente al método por absorción e inhibición, aquí el acontecimiento significativo es la aglutinación en ciertas pruebas de suero.<sup>4</sup>

### **2.11. El método adsorción e inhibición**

Que consiste en buscar la disminución de la dosificación de un suero estandarizado anti-A, anti-B y anti-H (O), en función de la presencia de antígenos homólogos sobre el substrato por examinar<sup>4</sup>.

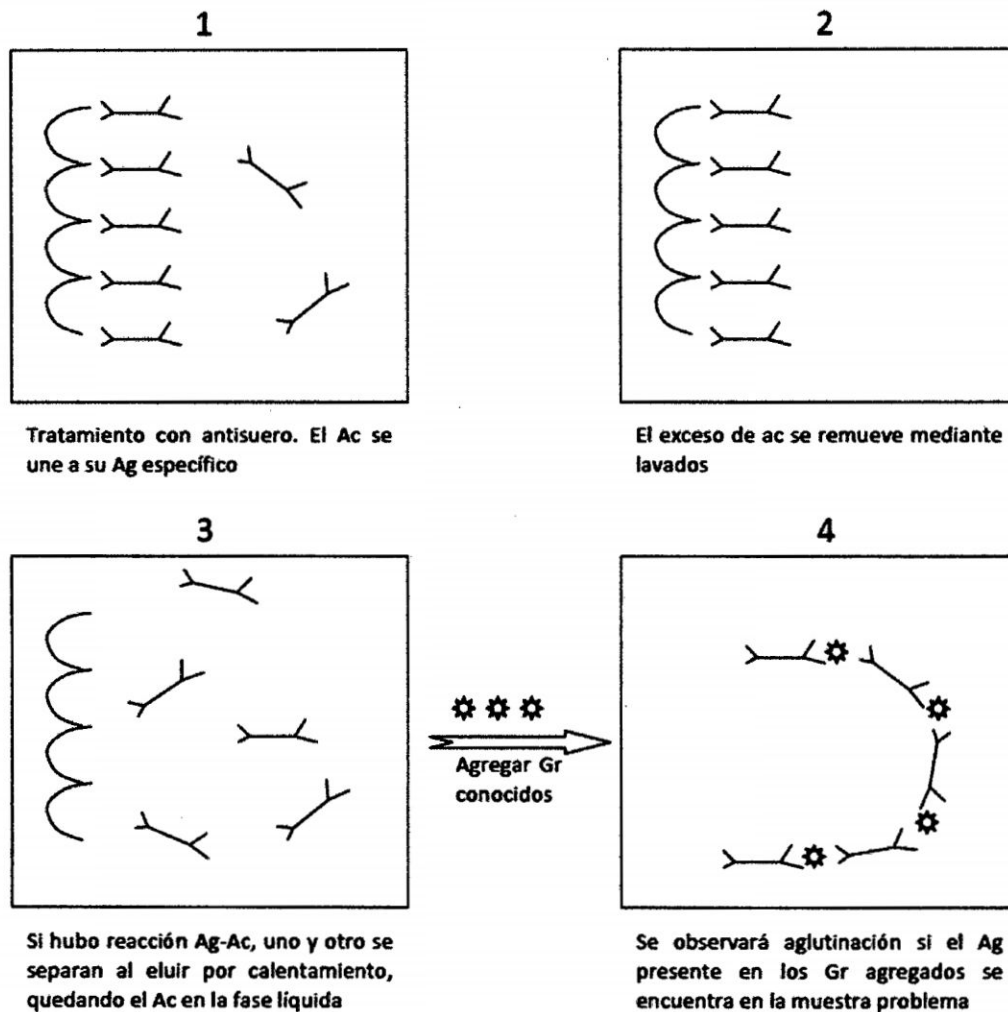
Para ello, se utilizan dos series de sueros, uno que contiene los anti-A, el otro los anti-B, en concentraciones diversas y conocidas. A cada uno de dichos sueros se añade una fracción de la muestra y se deja que sus aglutinas reaccionen con los aglutinógenos de este último, implicando esta reacción la absorción de aglutininas por los aglutinógenos.<sup>4</sup>

### **2.12. Fundamento de la técnica adsorción - elución**

En muestras de sangre fresca, el problema es más simple ya que se reduce a evidenciar la presencia de los antígenos de los eritrocitos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos. En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son viables; sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente debido a la sequedad y sobreviven por algún tiempo, conservando la capacidad de aglutinación antes mencionada. La formación de la reacción antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas de las manchas de sangre seca. El método tradicional de absorción-inhibición fue utilizado durante varios años con ese fin, pero es menos confiable comparado con otras técnicas modernas, como la de absorción-elución. Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un soporte adecuado (ejemplo: fibras textiles), las partículas que se adhirieron, conservan de forma eficiente el material antigénico. Ésta última técnica está fundamentada en un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo correspondiente; una vez completada la absorción, el anticuerpo sobrante se elimina lavando con solución salina fría. La reacción antígeno-anticuerpo se disocia calentando a 56 °C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con glóbulos rojos lavados de propiedades antigénicas conocidas, finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido. La técnica de absorción elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca y también se sabe que puede usarse para los sistemas MN y Rh, aun cuando en el primero sus antígenos son más difícilmente detectables por la inespecificidad y mala calidad de los antisueros

disponibles. Y en el caso del Rh se requiere mayor cantidad de muestra por tener que estudiarse el Rh propiamente dicho y los otros grupos del sistema<sup>4</sup>.

La técnica de absorción-inhibición debe ser empleada de todas maneras simultáneamente a la anterior para la determinación de grupo en manchas de sangre, y por otra parte es importante señalar que es el procedimiento de elección en la determinación de grupo en saliva y semen, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble<sup>4</sup>.



**Figura N° 04:** Fundamento de la técnica de Adsorción – elución, y el fenómeno de elución mediante el rompimientos de los enlaces puente de hidrógeno, mediante temperatura elevada.<sup>4</sup>

### **2.13. Fundamento de la técnica adsorción - elución modificado**

Esta técnica deriva del método adsorción - inhibición, también podría denominarse de absorción – dilución. Consiste en confrontar porciones de las manchas a analizar con suero anti A y anti B, respectivamente.<sup>20</sup>

Una vez superada esta etapa, durante la cual se producirá la formación del complejo antígeno – anticuerpo, se procede a diluir la solución del suero tipificador donde estarán los anticuerpos no reaccionantes con una progresión aritmética, 1/2, 1/4, 1/8, etc. Finalmente se determina el título o concentración de los anticuerpos no reaccionantes mediante el agregado de gotas de suspensión de glóbulos rojos determinándose hasta que concentración puede verificarse la formación de aglutinación. Con los blancos no debiera producirse reacción por lo tanto ese será el título máximo en donde no hubo “consumo” de anticuerpos originales. De haber en las muestras una disminución de título esa circunstancia nos estaría indicando la presencia en la muestra del antígeno respectivo.<sup>21</sup>

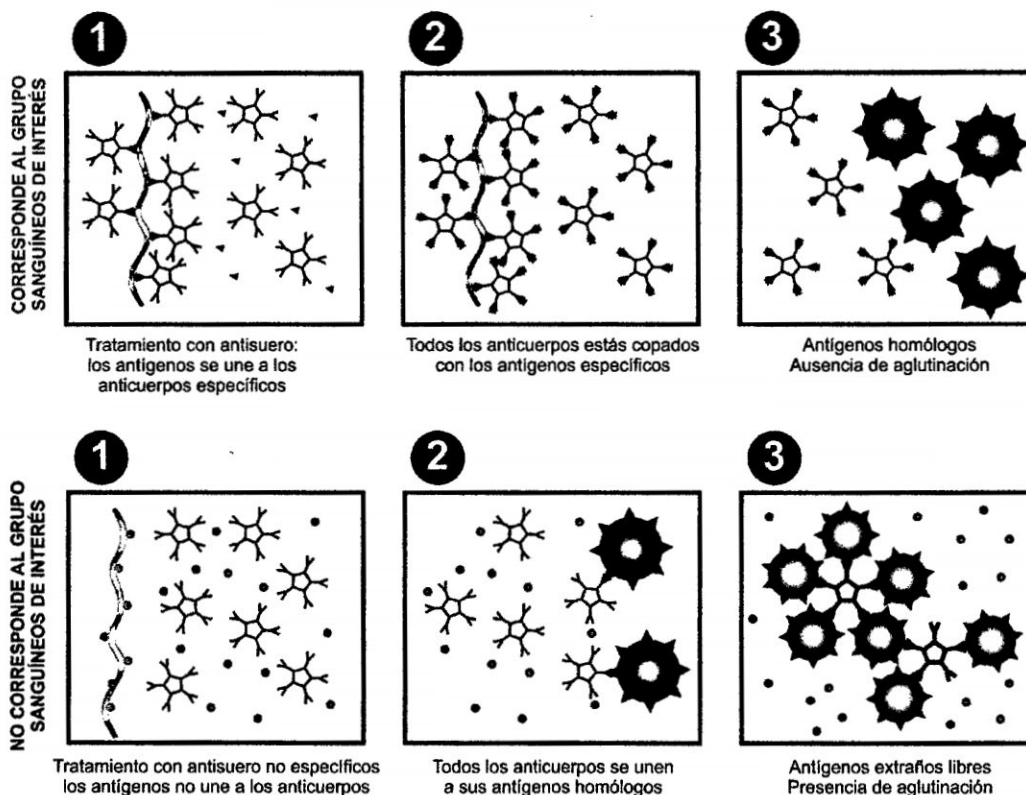
Para efectuar el ensayo se requiere una poli cubeta de vidrio transparente, con 4 hileras de excavaciones, siendo lo ideal que cada hilera conste de un mínimo de 12 pocillos (o también usar tubos de ensayo en vez de pocillos). En la primera excavación de cada hilera se coloca una alícuota del material a analizar, blancos y muestras respectivamente (2 y 2). En un par se colocan 11 gotas de suero anti A y en el otro de suero anti B, diluidos 1/32. Se tapan las excavaciones con una placa de vidrio para impedir la concentración por evaporación y se deja un mínimo de 2 horas en reposo.<sup>21</sup>

El reactivo utilizado aporta anticuerpos que reaccionaran con el antígeno correspondiente según el diagrama antigénico de la sangre analizada, durante esta formación los anticuerpos reaccionantes se adhieren firmemente a los antígenos respectivos de modo que los anticuerpos sobrantes están en menor concentración que la original, cosa que se respeta por ausencia de antígeno en la muestra, tal como sucede en los denominados blancos.<sup>21</sup>

Al finalizar el periodo de incubación, se coloca en cada una de las excavaciones restantes una gota de solución fisiológica y a continuación se transfiere una gota del líquido de la primera excavación a la segunda, se homogeneiza, se pasa una gota de la segunda a la tercera, se homogeneiza y así sucesivamente hasta terminar. El resultado que en cada excavación la concentración es la mitad de la anterior. Siendo la concentración original de los anticuerpos anti A y anti B, 1/32, quedará 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, 1/8192, etc.<sup>20</sup>

Finalmente mediante el agregado de 1 gota de suspensión de glóbulos rojos lavados A y B respectivamente a cada excavación se podrá establecer el título o concentración remanente en cada hilera observando cual es la dilución máxima en la cual se produce aglutinación, es decir acumulo de glóbulos rojos formando el ya mencionado "racimo".<sup>21</sup>

Como ya dijimos, en los blancos no hay reacción de modo que en esas hileras la concentración original no estará alterada y por lo tanto allí se observará el mayor título. Por el contrario, si hubiera interacción antígeno-anticuerpo, el consumo de anticuerpos que sucedería en dicha reacción, generará una disminución del título respectivo de anticuerpos A ó B, o ambos, según el caso. Se establece como disminución significativa un mínimo de dos niveles. Como vemos una disminución del título blanco con respecto a la muestra, está indicando la presencia de los antígenos correspondientes.<sup>21</sup>



**Figura N° 05:** Fundamento de la técnica de Adsorción – elución modificado, y el fenómeno de inhibición de los anticuerpos.<sup>4</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización de zona de estudios**

El presente trabajo de investigación se realizó en el ambiente del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela de Formación profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a una altitud de 2760 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 19,5°C y una humedad relativa promedio de 46%.

#### **3.2. Muestra**

Se consideró a 04 personas voluntarias que pertenecieran al sistema del grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" de la ciudad de Ayacucho.

##### **3.2.1. Sistema de muestreo**

El sistema de muestreo fue del tipo intencional, se trabajó con personas voluntarias.

##### **3.2.2. Características de la muestra**

Las muestras de sangre obtenida para el experimento, fueron de personas mayores de 20 a 25 años, entre mujeres y varones.

#### **3.3. Fase pre-analítica**

##### **3.2.1. Desinfección del área de trabajo**

Se desinfectó la mesa de trabajo con alcohol 96° y con lejía al 5%, antes y después de cada ensayo.

##### **3.2.2. Preparación de la muestra**

- Se obtuvo sangre venosa 6 – 8 ml por goteo en tubos con EDTA 5.4 mg, para cada uno de los grupos sanguíneos: "A", "B" y "AB".
- Se diluyeron las muestras de sangre con solución salina fisiológica de la siguiente manera: 1/2 (50%), 1/4 (25%), 1/10 (10%), 1/20 (5%), 1/50 (2%), 1/100 (1%), Repitiendo para cada uno de los grupos sanguíneos mencionados.

- Se manchó por goteo en las telas de algodón (color blanco) con dimensión de 5x5 cm, para cada uno de las diluciones.
- Se dejó secar las telas manchadas de sangre en condiciones de laboratorio por un periodo de 48 horas.
- Se recortó las telas manchadas y secas de 3x3 mm, para la técnica de Adsorción-elución; y se recortó 10x10 mm para la técnica de Adsorción-elución modificado.

### **3.3. Fase analítica**

#### **3.3.1. Técnica de absorción – elución**

- En una placa excavada de 4x5 excavaciones, se colocó pequeños recortes 3x3mm de tela manchada con sangre, en el siguiente orden: “A”, “B” y “AB”, se agregó una gota de suero anti “A” y anti “B”.
- Se dejó a macerar por 24 horas a temperatura de laboratorio.
- Se lavó las fibras en tubos de prueba rotulados con A y B con solución salina fisiológica con ayuda de una bagueta de manera suave por tres veces, y se invirtieron los tubos para escurrir las telas.
- Luego se eliminó la fibra textil y se adicionó una gota de suero fisiológico.
- Se colocó en baño María 56 °C por 10 minutos. Se retiró los tubos y se dejó enfriar.
- Se retiró las fibras manteniendo únicamente la gota de suero fisiológico en cada tubo.
- Se agregó a los tubos glóbulos rojos al 5%, del grupo “A” y “B” respectivamente. (previamente lavados).
- Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos.
- Se observó el botón de hematíes en la base de cada tubo, y se agitó suavemente haciendo golpeteos con el dedo pulgar por 10 segundos.
- Se realizó la lectura mediante la presencia de aglutinación con el signo ( + ) y ausencia de aglutinación con el signo ( - ).<sup>4</sup>

#### **3.3.2. Técnica de adsorción - elución modificado**

##### **a. Determinación del título de isoaglutininas de anticuerpos**

- Los antisueros monoclonales Biotec anti-A y anti-B, fueron diluidos sucesivamente hasta 1:128, por separados en tubos de ensayo que contenían 500µL de solución salina fisiológica y 500µL del antisuero correspondiente.
- Se enfrentó 100 µL de cada dilución (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128) con 100 µL hematíes lavados al 2% (del grupo sanguíneo “A”, “B” y “AB”), se

incubó a 37°C por 15 minutos en baño maría.

- Se centrifugó a 2500 r.p.m. por 3 minutos.
- Se agitó suavemente los tubos y se realizó la lectura del título de isoaglutininas de anticuerpos monoclonales Biotec anti-A y anti-B (ver Anexo 11).

**b. Determinación del grupo sanguíneo ABO en manchas**

- Se colocó en dos tubos marcados con "A" y "B", un corte de tela de algodón (color blanco) manchada con la muestra hemática (10 x 10 mm).
- Se agregó al primer tubo una gota de **anti-A diluido** y en el segundo tubo **anti-B diluido** y se realizó suaves movimientos de golpeteo (empapándolo los fragmentos de telas completamente).
- Se agregó 3 gotas de solución salina fisiológica a todos los tubos, con ayuda de un aplicador invertido sujetar el fragmento de tela en la base del tubo y se cubrió la boca de los tubos con una torunda de algodón.
- Se agitó suavemente y se incubó en una estufa a 37°C por 15 minutos exactamente.
- Se destapó los tubos y se extrajo las telas contenidas en los tubos con la ayuda de su mismo aplicador.
- Se agregó a cada tubo una gota de albúmina bovina al 2%.
- Se agitó suave y firmemente.
- Se incubó en una estufa a 37°C por 4 minutos.
- Se sacó del baño María y se agregó a cada tubo una gota de hematíes lavados del tipo "A" y "B" al 2%, se agitó e incubó a 37°C por 15 minutos.
- Se sacó del baño maría y se centrifugó a 2500 r.p.m. por 3 minutos.
- Se observó el botón de hematíes en la base de cada tubo, y se agitó suavemente haciendo golpeteos con el dedo pulgar por 10 segundos.
- Se realizó la lectura mediante la presencia de aglutinación con el signo ( + ) y ausencia de aglutinación con el signo ( - ).<sup>4</sup>

### 3.4. Fase post-analítico

#### 3.4.1. Interpretación de resultados

##### a. Técnica de adsorción - elución

- Si ocurrió aglutinación en el tubo "A", pero no hubiese aglutinación en el tubo "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "A".
- Si no ocurrió aglutinación en el tubo "A", pero si hubiese aglutinación en el tubo "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "B".
- Si ocurrió aglutinación en ambos tubos "A" y "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "AB".

##### b. Técnica de adsorción - elución modificado

- Si no ocurrió aglutinación en el tubo "A", pero si hubiese aglutinación en el tubo "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "A".
- Si ocurrió aglutinación en el tubo "A", pero no hubiese aglutinación en el tubo "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "B".
- Si no ocurrió aglutinación en ambos tubos "A" y "B", entonces la muestra pertenecerá al grupo sanguíneo "AB".

### 3.5. Recolección de datos

Para ambas técnicas forenses se llenó los resultados en fichas incluyendo los siguientes datos: grupo, técnica, observación macroscópica y microscópica de aglutinaciones, tiempo, fecha, nombre del operador y observaciones.

### 3.6. Diseño de investigación

El diseño de nivel cuasi-experimental.

### 3.7. Análisis de datos

Se procesaron los datos con el modelo estadístico no paramétrico, regresión logística binaria a través de los coeficientes de verosimilitud, el cual se estimó la relación existente entre la variable respuesta no métrica (aglutinaciones), en particular dicotómica (1, 0) y las variables independientes métricas o no métrica (tiempo y concentración)<sup>22</sup>. Fueron procesadas de la siguiente manera:

- **Primera fase:** Los datos expresados en ausencia y presencia de aglutinación (signos "+" y "-"), fueron ordenados y agrupados en 4 tablas en función a su grupo sanguíneo correspondiente, utilizando la moda (el valor con una mayor frecuencia en una distribución de datos), representado finalmente en datos binarios (1 y 0), se utilizó el software Excel 2013.
- **Segunda fase:** Los datos del Excel fueron insertados en las celdas y procesados por el software MiniTab v17, se determinó el modelo de regresión logística con sus respectivo gráficos de desviación corregidas y los coeficientes de verosimilitud para su posterior interpretación.

## IV. RESULTADOS

**Tabla 1.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo "A"**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción - elución**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo "A" en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	+	+	+
18	-	-	-	+	+	-
20	-	-	-	+	+	+
22	-	-	-	+	+	-
24	-	-	+	+	+	+
26	-	-	+	+	+	+
28	-	-	-	+	+	+
30	-	-	+	+	+	+
32	-	-	+	+	+	-
34	-	+	+	+	+	+
36	-	-	+	+	+	+
38	-	-	+	+	+	+
40	-	-	+	+	+	+
42	-	+	+	+	+	+
44	-	-	+	+	+	+
46	-	-	+	+	+	+
48	-	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+	+
52	-	-	+	+	+	+
54	-	-	+	+	+	-
56	-	+	+	+	+	+
58	-	-	+	+	+	-
60	-	+	+	+	+	+

**Leyenda:** (-) Ausencia de aglutinación; (+) Presencia de aglutinación.

**Tabla 2.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo “B”**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción - elución**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo “B” en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	-	-	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
14	-	+	+	+	+	+
16	-	-	+	+	+	-
18	-	-	+	+	+	+
20	-	-	+	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+
24	-	+	-	+	+	+
26	-	-	+	+	+	+
28	-	-	+	+	+	+
30	-	+	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+	+
34	-	-	+	+	+	+
36	-	+	+	+	+	+
38	-	-	+	+	+	-
40	-	-	+	+	+	+
42	-	-	-	+	+	+
44	-	-	+	+	+	+
46	-	-	+	+	+	+
48	-	-	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+	+
52	-	+	+	+	+	+
54	-	+	+	+	+	+
56	-	-	-	+	+	+
58	-	-	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+	+

Leyenda: ( - ) Ausencia de aglutinación; ( + ) Presencia de aglutinación.

**Tabla 3.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo “AB”**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción - elución**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo “AB” en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	-	-	+	+	+	-
4	-	+	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	-
14	-	+	-	+	+	+
16	-	-	+	+	+	+
18	-	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+
22	-	+	+	+	+	-
24	-	+	+	+	+	-
26	-	+	+	+	+	+
28	-	-	+	+	+	+
30	-	-	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+	+
34	-	-	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	-
38	-	-	-	+	+	+
40	-	+	+	+	+	+
42	-	-	+	+	+	+
44	-	+	-	+	+	+
46	-	+	+	+	+	+
48	-	-	+	+	+	-
50	-	-	+	+	+	-
52	-	+	+	+	+	+
54	-	-	+	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+
58	-	-	+	+	+	-
60	-	+	+	+	+	-

Legenda: (-) Ausencia de aglutinación; (+) Presencia de aglutinación.

**Tabla 4.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo “A”**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción – elución modificados**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo “A” en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	+	-	+	+	-	-
4	+	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-
20	+	+	+	-	-	-
22	+	+	+	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-
26	+	+	+	+	-	-
28	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	-	-	-
32	+	+	+	-	-	-
34	+	+	+	+	+	-
36	+	+	+	-	+	-
38	+	+	+	-	-	-
40	+	+	+	-	-	-
42	+	+	+	+	-	-
44	+	+	+	-	-	-
46	+	+	+	-	-	-
48	+	+	+	+	+	-
50	+	+	+	-	-	-
52	+	+	+	-	-	-
54	+	+	+	+	-	-
56	+	+	+	-	-	-
58	+	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	-	-

**Leyenda:** (-) : Ausencia de aglutinación; (+) : Presencia de aglutinación

**Tabla 5.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo “B”**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción – elución modificados**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo “B” en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	+
12	+	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-
22	+	+	+	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-
26	+	+	+	+	-	-
28	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-
34	+	+	+	+	-	-
36	+	+	+	-	-	-
38	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	-	-
42	+	+	+	-	-	-
44	+	+	+	+	-	-
46	+	+	+	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	-	-
52	+	+	+	+	-	-
54	+	+	+	+	-	-
56	+	+	+	+	-	-
58	+	+	+	+	-	-
60	+	+	+	-	-	-

**Leyenda:** (-) : Ausencia de aglutinación; (+) : Presencia de aglutinación

**Tabla 6.** Aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre (**grupo sanguíneo “AB”**) diluidas a diferentes concentraciones y procesadas durante 60 días, con la técnica de **Adsorción – elución modificados**. Ayacucho, 2015.

Tiempo (Días)	Concentraciones de sangre del grupo sanguíneo “AB” en manchas					
	1%	2%	5%	10%	25%	50%
2	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-
20	+	+	+	+	-	-
22	+	+	+	+	-	-
24	+	+	+	+	-	-
26	+	+	+	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-
30	+	+	+	+	-	-
32	+	+	+	-	-	-
34	+	+	+	-	-	-
36	+	+	-	-	-	-
38	+	+	+	-	-	-
40	+	+	+	-	-	-
42	+	+	+	-	-	-
44	+	+	+	-	-	-
46	+	+	-	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	-	-
52	+	+	-	-	-	-
54	+	+	+	+	-	-
56	+	+	+	-	-	-
58	+	+	+	-	-	-
60	+	+	+	+	-	-

Leyenda: ( - ) : Ausencia de aglutinación; ( + ) : Presencia de aglutinación

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Técnica de Adsorción – elución.

En la Tabla Nº 1, se observa aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre del sistema de grupo sanguíneo “A”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimos sólo a las concentraciones 10% y 25%, para determinar el sistema de grupo sanguíneo “A” en manchas sanguíneas; Mientras que no posee una antigüedad óptima de la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “A”, durante 60 días.

En la Tabla Nº 2, se observa aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre, del sistema de grupo sanguíneo “B”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimos sólo a las concentraciones 10% y 25% por ser muy buenas. Mientras que no posee una antigüedad óptima de la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “B”, durante 60 días.

En la Tabla Nº 3, se observa aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre, del sistema de grupo sanguíneo “AB”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimos sólo a las concentraciones 10% y 25% por ser muy buenas. Mientras que no posee una antigüedad óptima de la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “AB”, durante 60 días.

Villegas, Acevedo, Miranda, Pinto<sup>1</sup>, trabajaron con telas de algodón manchadas con sangre humana y grupo sanguíneo ABO, diluidos en 1/1, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 y 1/10000; obteniendo resultados positivos en 24 horas de todos los grupos en 1/1 y 1/100, excepto el grupo AB en dilución 1/100 (considerándolo inconcluyente).

Villegas, Acevedo, Miranda, Pinto<sup>1</sup>, también trabajaron en función al tiempo, pero sin diluir la muestra de sangre (24 horas, una semana y un mes) y a -20°C, 4°C

37°C y 60°C de temperaturas, obteniendo resultados esperados en todos los tiempos.

## **5.2. Técnica de Adsorción – elución modificado.**

En la Tabla N° 4, se observa ausencia de aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre, del sistema de grupo sanguíneo “A”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimo sólo a la concentración 50%. Mientras que no posee una antigüedad óptima de la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “A”, durante 60 días.

En la Tabla N° 5, se observa ausencia de aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre, del sistema de grupo sanguíneo “B”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimo sólo a la concentración 25%. Mientras que no posee una antigüedad óptima de la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “B”, durante 60 días.

En la Tabla N° 6, se observa ausencia de aglutinaciones en muestras de telas manchadas con sangre, del sistema de grupo sanguíneo “AB”, diluidas a diferentes concentraciones y procesadas en 60 días las mismas muestras, considerándose óptimo a ninguna concentración. Mientras que no posee una antigüedad óptima en la mancha de sangre que nos permita determinar el grupo sanguíneo “AB”, durante 60 días.

Villegas, Acevedo, Miranda, Pinto<sup>1</sup>, trabajaron con telas de algodón manchadas con sangre humana y grupo sanguíneo ABO, diluidos en 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 y 1/10000; obteniendo buenos resultados con la dilución 1/100 para todos los grupos y resultados dudosos en la dilución 1/500.

Villegas, Acevedo, Miranda, Pinto<sup>1</sup>, no trabajaron con muestras de sangre diluidas, pero sí a diferentes tiempos (24 horas, una semana y un mes) y a -20°C, 4°C 37°C y 60°C de temperaturas, obteniendo resultados esperados en todos los tiempos positivos.

## VI. CONCLUSIONES

1. La concentración de sangre óptimas que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" en telas manchadas de sangre, utilizando la técnica de **adsorción – elución** fue 10% y 25%, en tanto la técnica de **adsorción – elución modificado** tuvo una concentración óptima de 50%, para determinar el grupo sanguíneo "A", un 25% para determinar el grupo sanguíneo "B", y sin concentración óptima para tipificar el grupo sanguíneo "AB".
2. La antigüedad de mancha de sangre en telas, que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", utilizando la técnica de adsorción – elución, no posee una antigüedad óptima, al igual que la técnica de adsorción – elución modificado.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Estandarizar la prueba de Adsorción-elución modificado, ya puede considerarse como test diagnóstico, sin embargo no se basa en la comparación con un gold standard (patrón de oro o patrón de referencia) que otorga la condición de la máxima certeza conocida.
2. Usar reactivos monoclonales ABO de marca como: Diagast Lab, Biotec Lab, Wiener Lab y otros, no las genéricas que no llevan el nombre de la fábrica en la etiqueta del reactivo, porque no resultan el experimento con normalidad. De igual modo con la albúmina bovina 22% y su marca Linear Chemicals, Biotec, Hoyfarma, 21Lab, etc.
3. Cada vez que se utilice los anticuerpo monoclonales anti-A, anti-B y la albúmina bovina 22%, siempre a temperar por 5 minutos y homogenizar invirtiendo el frasco repetidas veces.
4. Trabajar con controles positivos y negativos, para evitar falsos positivos y negativos al momento de reportar los resultados.
5. En todo momento tener presente la bioseguridad como barreras de protección (guardapolvos, guantes, mascarillas y otros), en la manipulación de muestras sanguíneas que son potencialmente peligrosos, y durante el experimento evitar salpicaduras, derrames de las muestras alrededor del laboratorio.
6. Realizar más aportes relacionados a la biología forense: espermatoología, hematología forense, entomología forense, inmunología forense, etc.

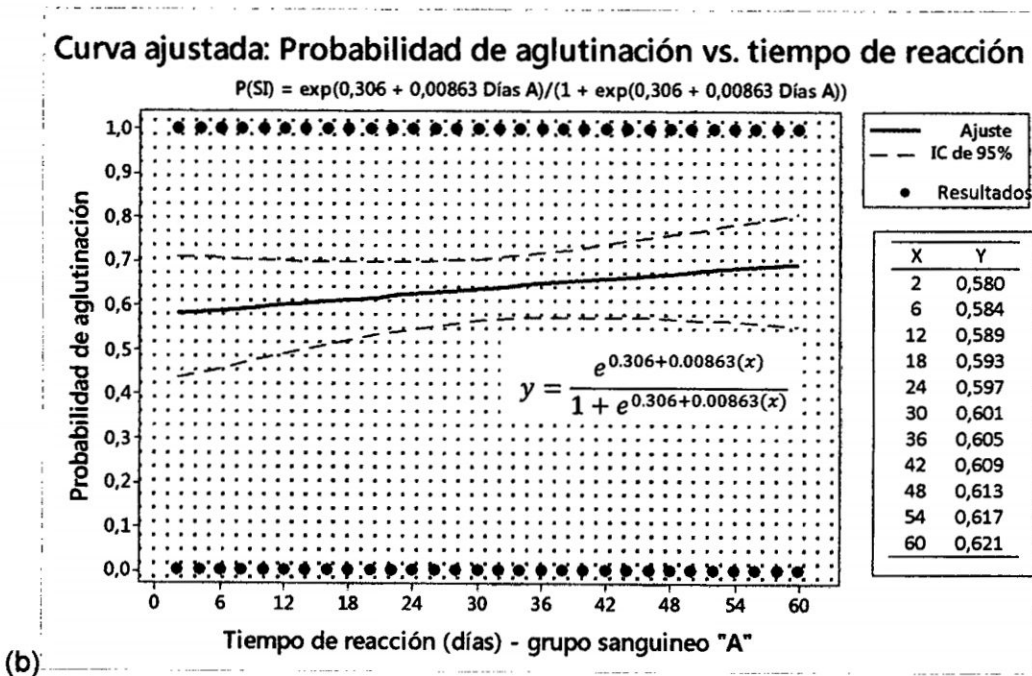
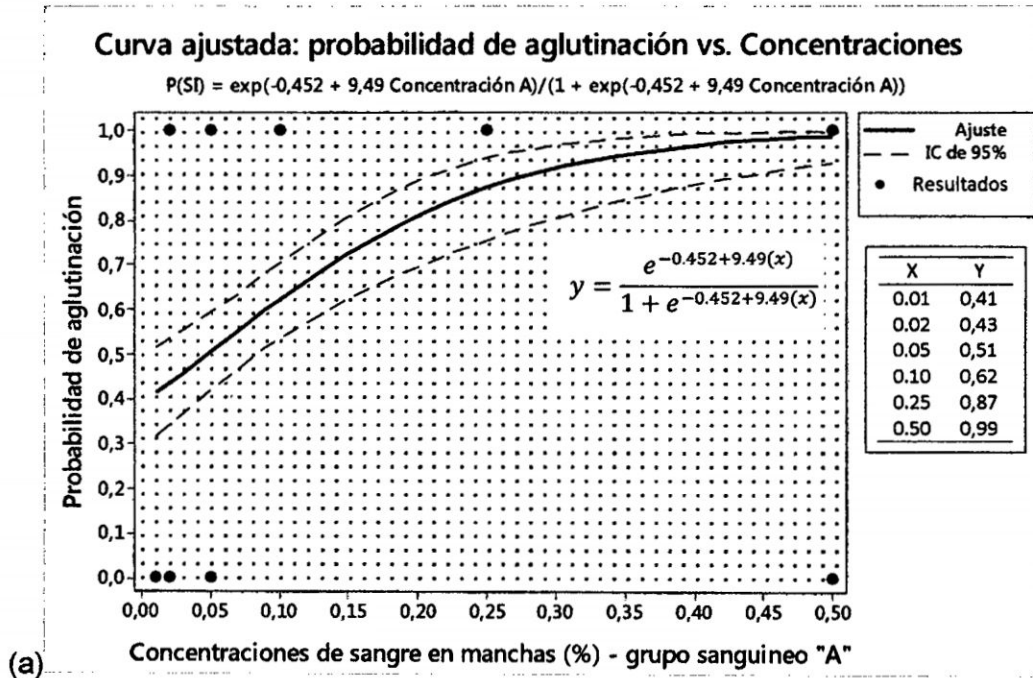
## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villegas M, Acevedo M, Miranda J, Pinto E. Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses. Cuad Med Forense [revista en Internet]. 2005 octubre. [acceso julio 2015], 11(42): 267-274. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/cmfn42/original1.pdf>
2. Carreño L. Técnicas utilizadas en hematología forense. [Sede Web]. Criminalística.mx. [actualizado enero de 2015; acceso junio 2015]; México. 2005: p7-8. Disponible en: <http://criminalistica.mx/areas-forenses/hematología-y-serología/1521-tecnicas-utilizadas-en-hematologia-forense>.
3. Gisbert J., Villanueva E. Medicina legal y toxicología. 6ª ed., Barcelona: Masson; 2004.
4. Franco, M. "Hematología forense y otras técnicas serológicas" 4ª ed, México: Porrúa; 2002.
5. Cacarico R. Evaluación de métodos de extracción de ADN humano a partir de muestras de sangre fresca, sangre seca e hisopeado bucal para la determinación de paternidad biológica por método de PCR-STR. FCFB; 2003.
6. López S. Tecnología del ADN en el procesado de muestras forenses. ed. Sevilla. 2003.
7. Gutiérrez A. Manual de ciencias forenses y criminalística. 2 ed. México: Trillas, 2002: 24-25 p.
8. Orlando R. Profesor del Instituto Nacional de Ciencias Forenses. Patrones sanguíneos. Seminario de ciencias forenses. Puerto Rico. 2010.
9. Policía Nacional del Perú, Manual de procedimiento de criminalística. Universo S.A. Lima – Perú. 2007.
10. Arbeláez L, Ríos L. Validación de los métodos Bluestar Forensic Free y Thevenono Roland- Pirimidon como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense. LBIF-INML y Cf Bogotá: ed. Seal editora. 2009.
11. Gisvert C. Medicina legal. C.E. Edic. Científicas y técnicas S.A. (4); 1991.
12. Gonzáles C. Técnica de laboratorio en biología forense – exámenes de laboratorio (recopilación). Carmen. Lima. Perú.
13. Gisvert C. Los indicios en medicina legal toxicología. 5 ed. Barcelona: Salbart. 1998:11-30.
14. Maza K. col. Falsas aglutinaciones por contaminación microbiana. España: ed. Edimb. editora. 1999; 7(1): 96-186.
15. Suárez B, Rivero J, Bencomo H y col. Ensayo de terreno de anticuerpos monoclonales hemoclasificadores obtenidos en Cuba. México. Siglo XXI editores; 1997;13(1): 63-69
16. Alfonso V. Bencomo H. Díaz S. y col. Caracterización serológica de anticuerpos monoclonales contra el sistema ABO y antígenos relacionados, México. Siglo XXI editores; 2000; 9(1): 124-131.
17. Rae M, Denomme G, Grossman B y col. Manual técnico AABB MSQA,MT edit. 15 Edic. 2007:p.284-290.
18. García B, Rubio F, Carrasco M. "Hematología 2: Hemostasia. Banco de Sangre. Control de calidad". Madrid. Paraninfo; 1998: p230-236.
19. Costa J. Albumina bovina 22%. [Sede Web] Linear Chemical. [actualizado marzo de 2008; acceso junio 2015]; Barcelona España. Disponible en: [www.linear.es](http://www.linear.es)
20. Alain B. Manual de criminalística moderna: La ciencia y la investigación de la prueba. México. Siglo XXI editores; 2006: p.77

21. Bustos M. Curso química. Módulo II. [Sede Web] CICRIM [actualizado enero de 2012; acceso julio 2015] Argentina, 2010. Disponible en: [http://av.cicrim.com.ar/courses/QUIMICA/document/Curso\\_Quimica\\_Forense\\_Modulo\\_II\\_-\\_parte\\_2.pdf](http://av.cicrim.com.ar/courses/QUIMICA/document/Curso_Quimica_Forense_Modulo_II_-_parte_2.pdf)
22. Modelo logístico [Sede Web] UNMSM Biblioteca virtual [actualizado mayo de 2012; acceso agosto 2015] Perú, 2007. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/Salcedo\\_pc/enPDF/Cap2.PDF](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/Salcedo_pc/enPDF/Cap2.PDF)
23. Gil P, Verdú F, Castelló F, Negre M. Técnica de criminalística en manchas de sangre: factor ambiental en las pruebas de orientación. Revista de la Escuela de Medicina Legal. Junio de 2010. [Revista en internet]. Madrid, España. 2010: p9-11. Disponible: <http://revistas.ucm.es/index.php/REML/article/view/REML1010220004A/22878>

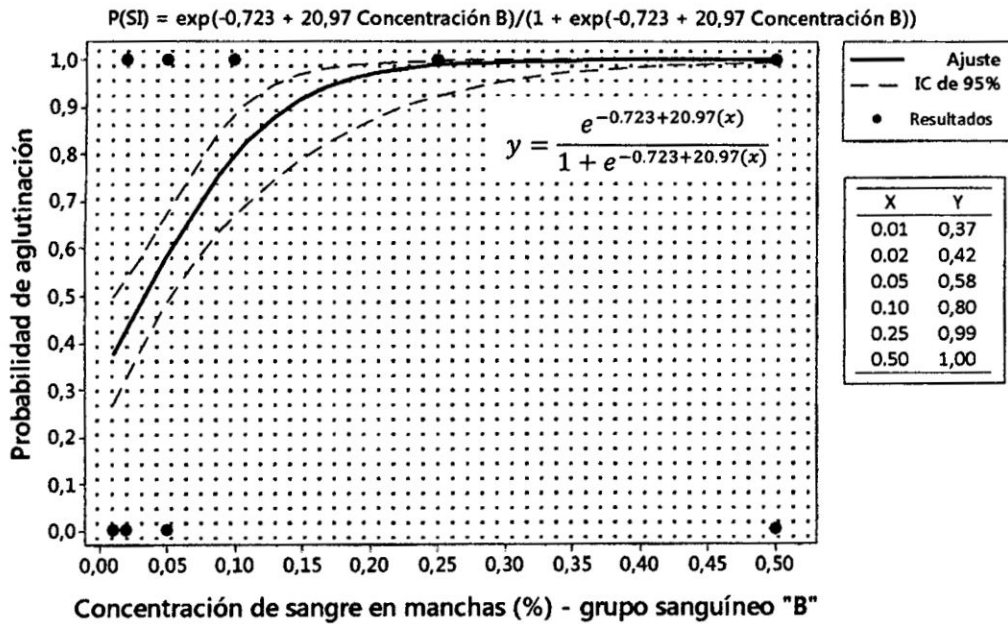
**ANEXOS**

**ANEXO 1.** (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción – elución**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "A"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "A".



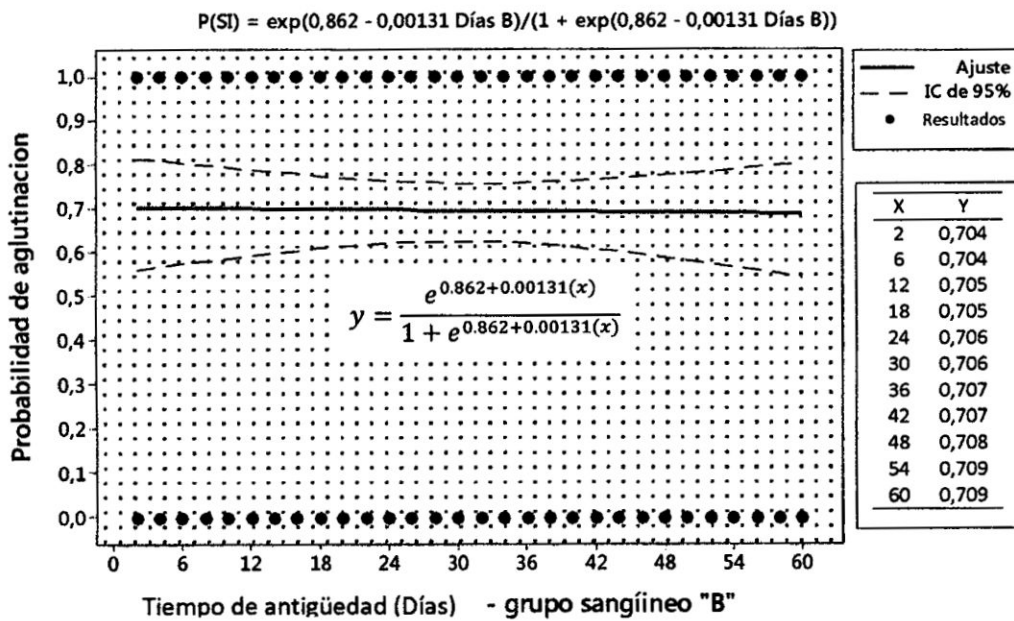
**ANEXO 2.** (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción – elución**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "B"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "B".

**Curva ajustada: Probabilidad de aglutinación vs. concentraciones (%)**



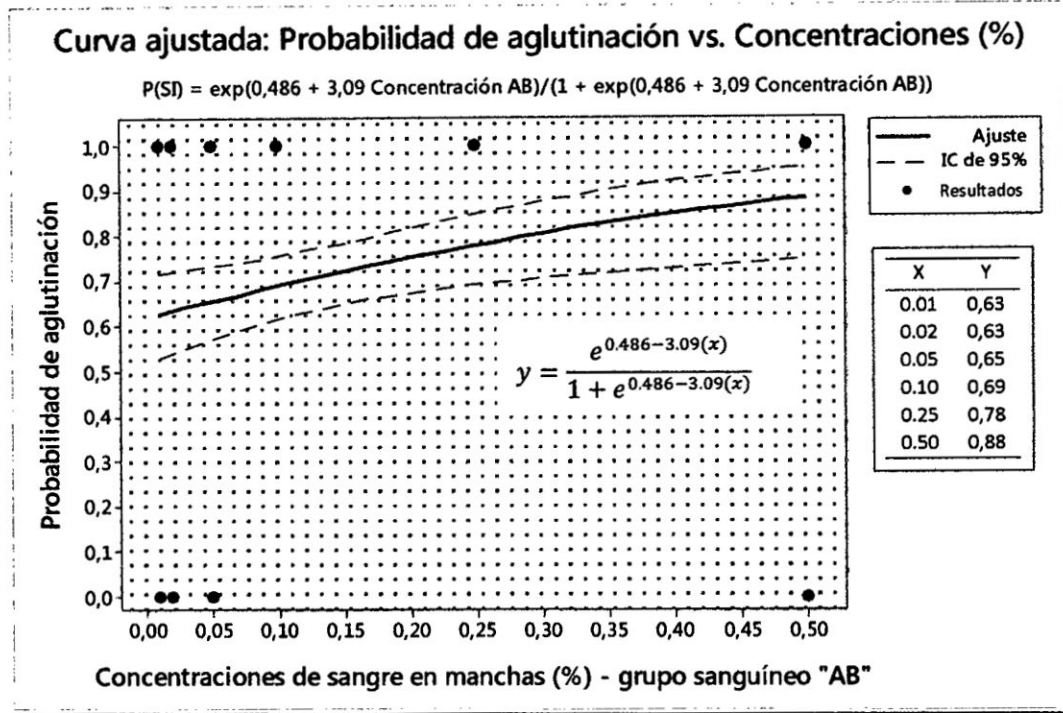
(a)

**Curva ajustada: Probabilidad de aglutinación vs. tiempo de antigüedad**

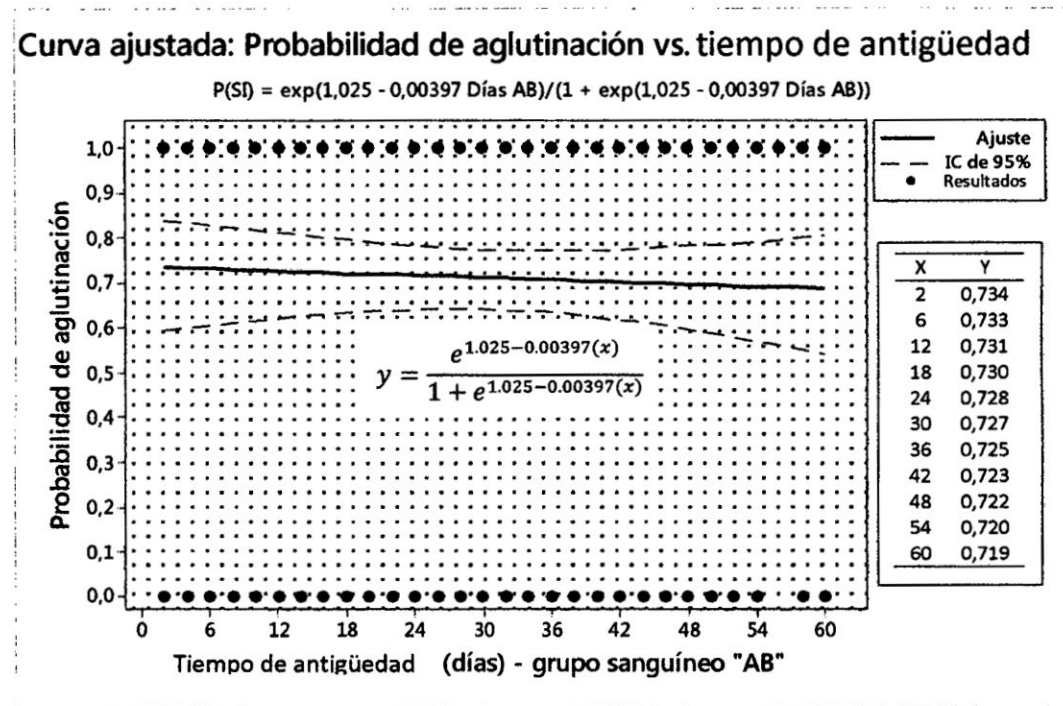


(b)

**ANEXO 3.** (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción – elución**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "AB"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "AB".

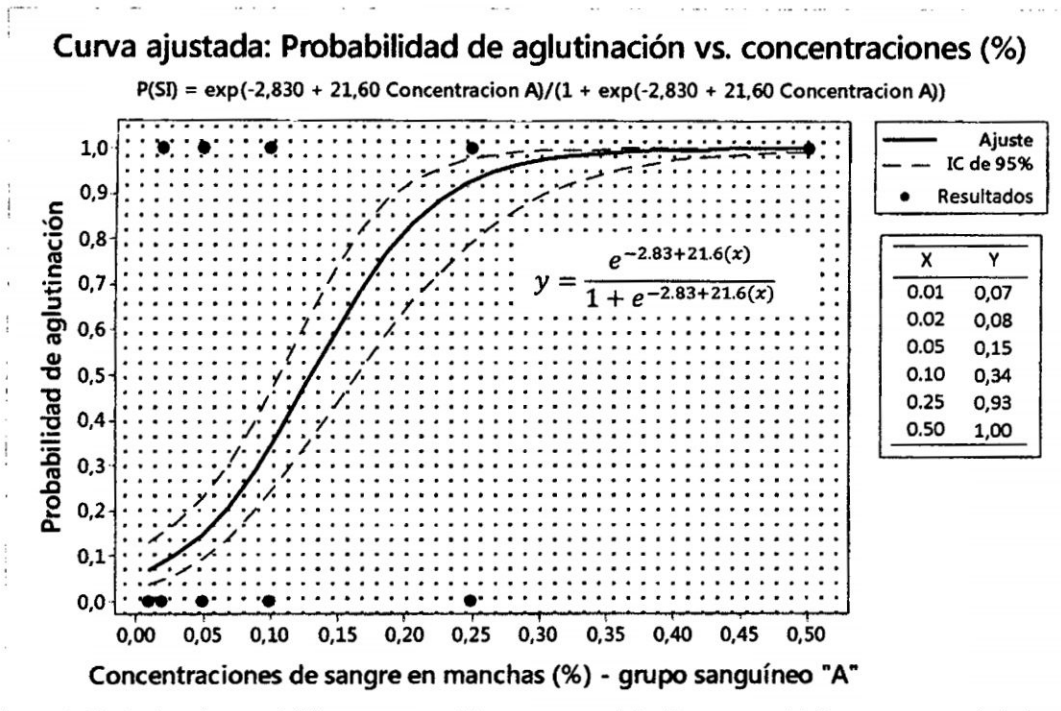


(a)

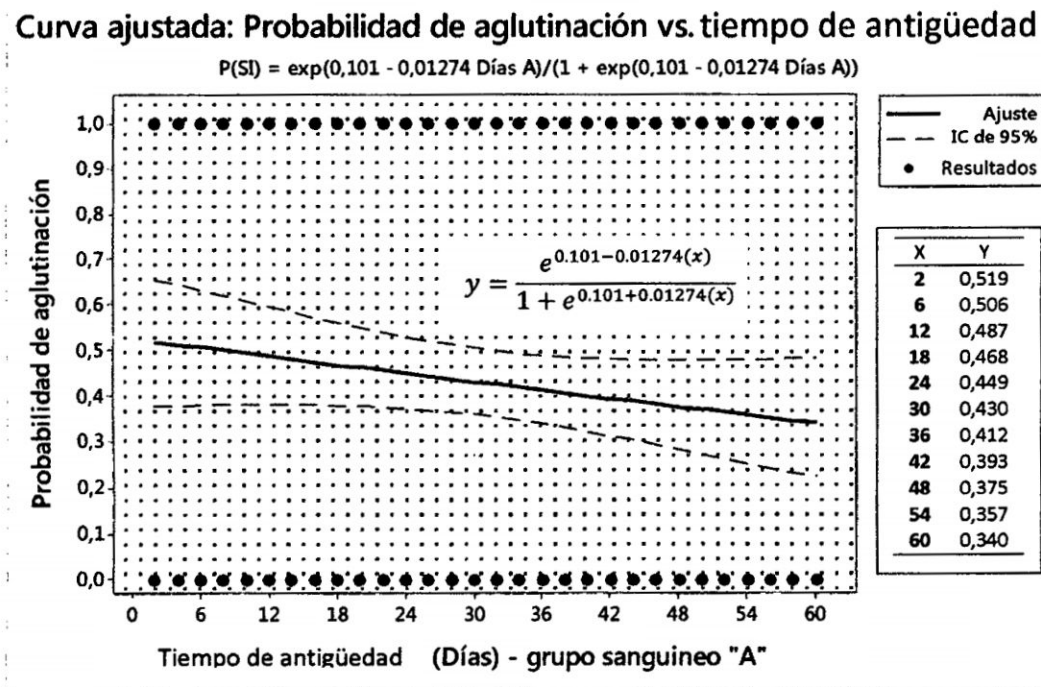


(b)

**ANEXO 4.** (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción - elución modificado**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "A"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "A".

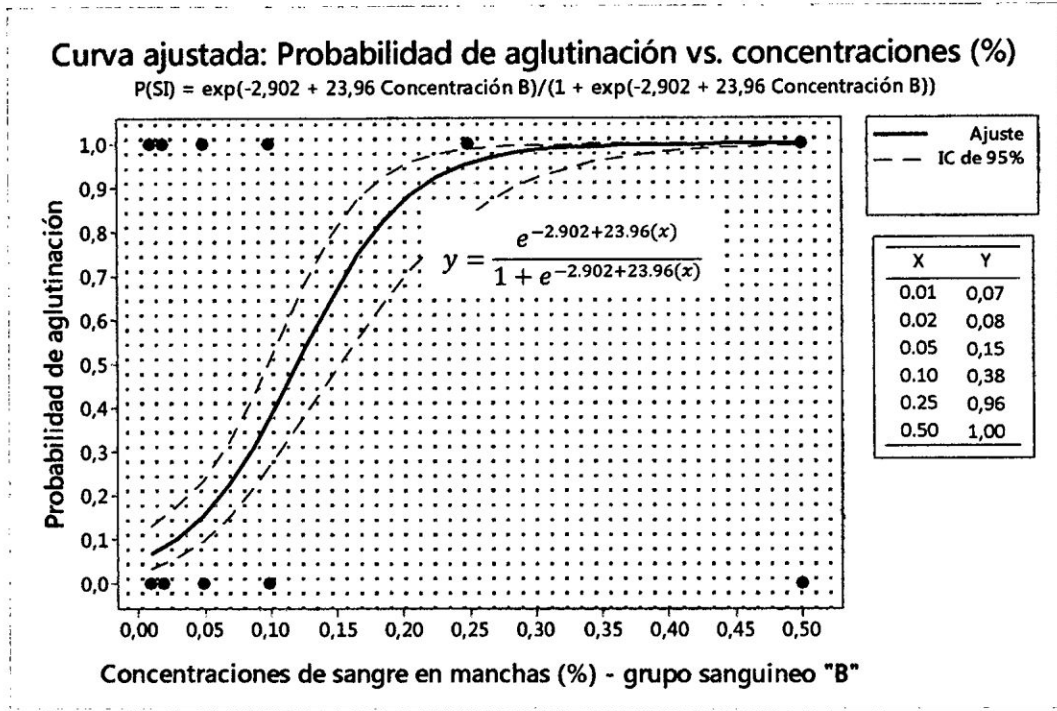


(a)

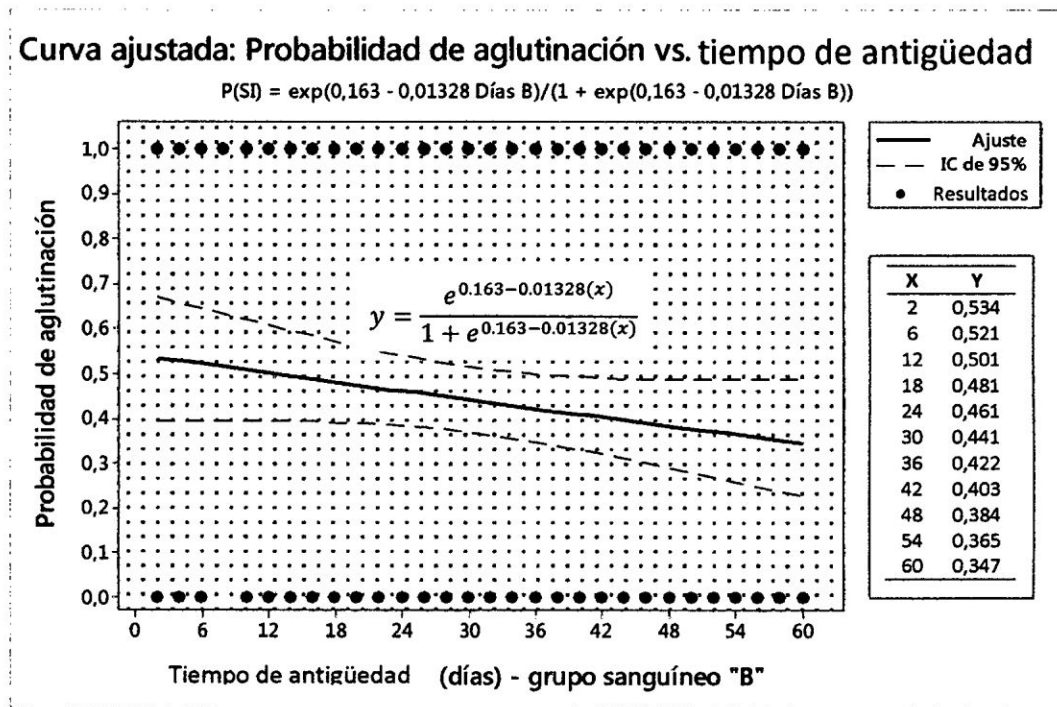


(b)

**ANEXO 5.** (a) Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción - elución modificado**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "B"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "B".

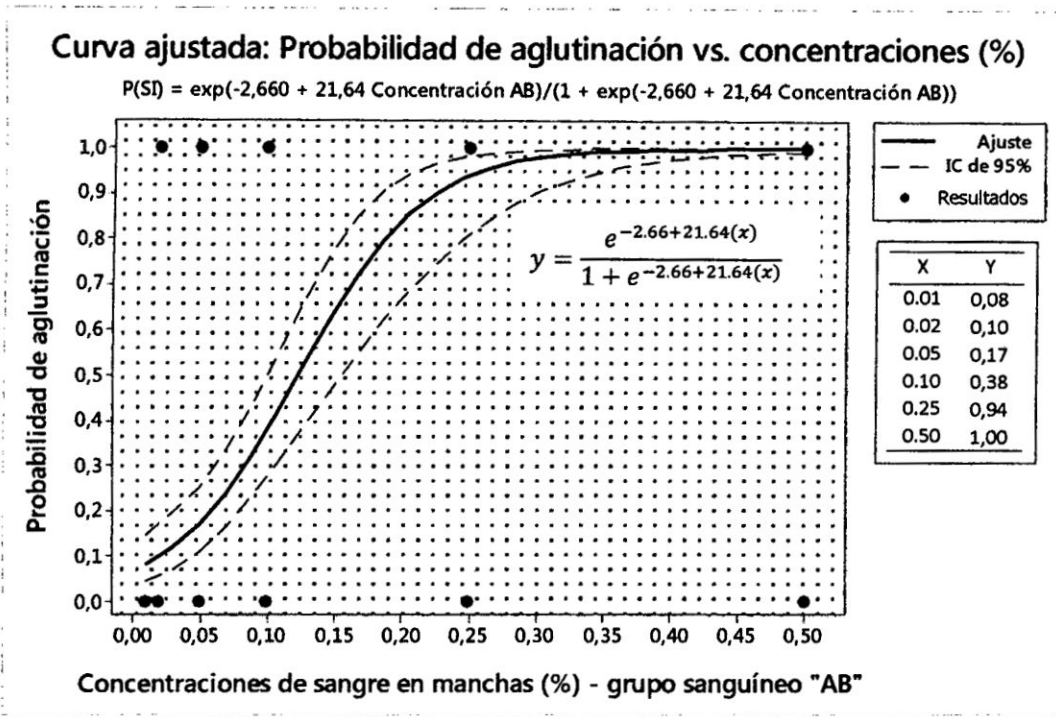


(a)

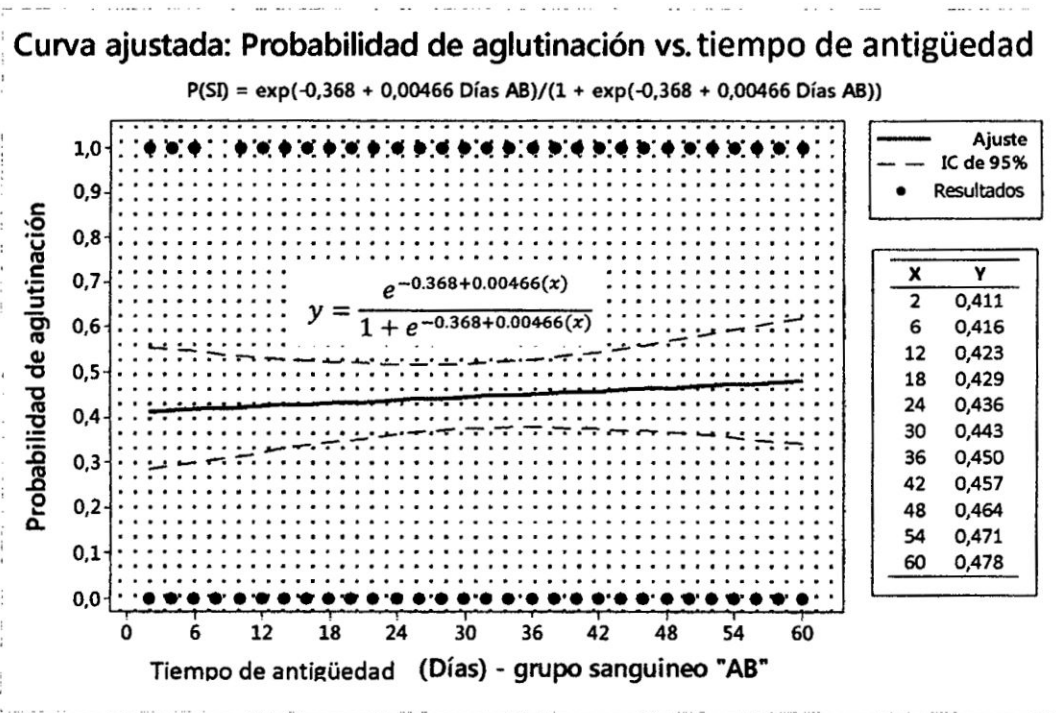


(b)

**ANEXO 6.** Regresión logística binaria (curva ajustada a la ecuación) – **Técnica de Adsorción - elución modificado**, software estadístico Minitab v17 a) Probabilidad de aglutinación vs. Concentración de sangre en manchas - **grupo sanguíneo "AB"**, (b) Probabilidad de aglutinación vs. Tiempo de antigüedad en manchas sanguíneas - grupo sanguíneo "AB".



(a)



(b)

**ANEXO 7. Título de isoaglutininas de antisueros monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B, Ayacucho, 2015.**

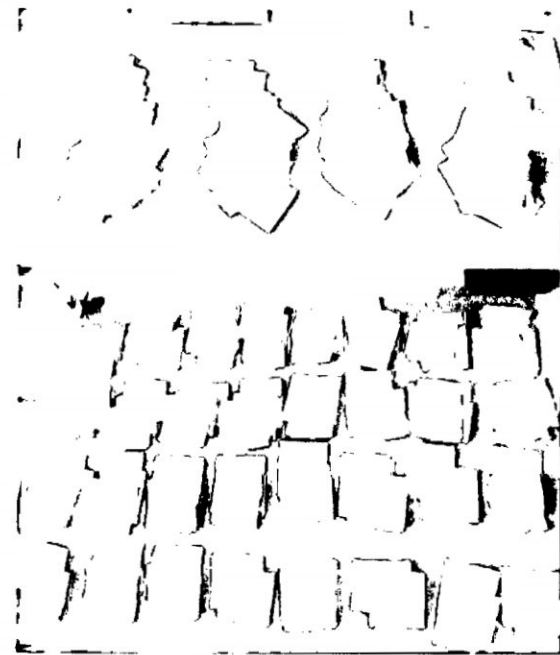
GRUPO	DILUCIONES ANTICUERPOS MONOCLONALES BIOTEC						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
A	4+	4+	4+	4+	2+	1+	-
B	4+	4+	4+	4+	2+	1+	-
AB (Anti-A)	4+	4+	4+	4+	3+	1+	-
AB (Anti-B)	4+	4+	4+	2+	-	-	-

**Legenda:** (-) No aglutinación; 1+ = Sí aglutinación; 2+ = Sí aglutinación; 3+ = Sí aglutinación; 4+ = Sí aglutinación

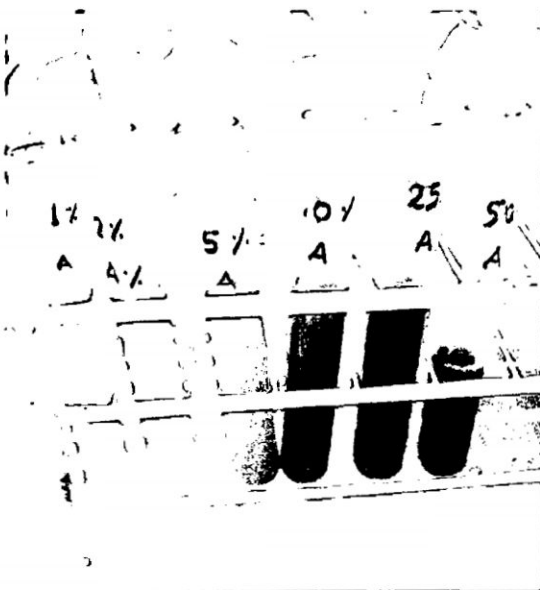
**ANEXO 8.** (a) Tela de algodón color blanco, (b) Recorte de la tela en dimensión 5 x 5 cm, (c) Preparación de hemáties en concentraciones diluidas, (d) Manchado por goteo en las telas de algodón con 15 - 16 gotas en cada trozo.



(a)



(b)



(c)

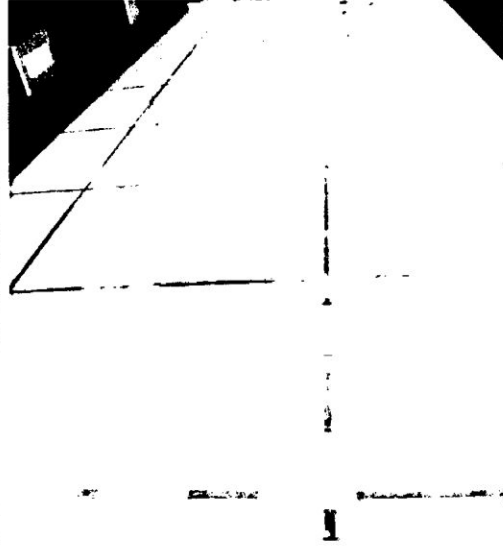


(d)

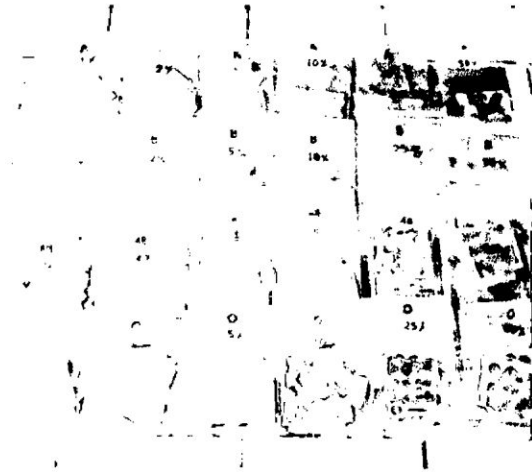
**ANEXO 9.** (a) y (b) Tela manchadas con sangre a diferentes concentraciones y secado a temperatura por 24 horas, (c) Etiquetar en sobres de plástico con cierre hermético, (d) almacenar las manchas secas en una cámara oscura para evitar el contacto de la luz.



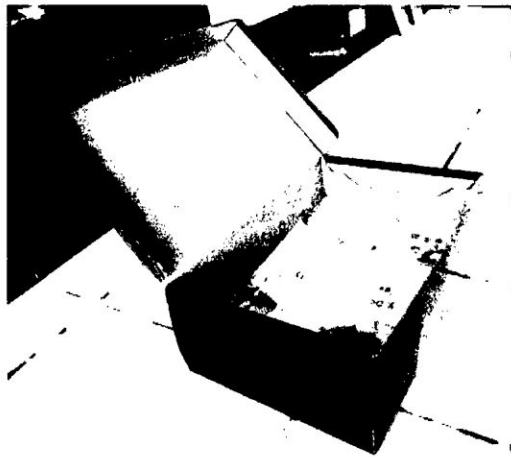
(a)



(b)



(c)



(d)

**ANEXO 10. Observaciones macroscópicas y microscópicas de aglutinaciones y su reporte en cruces.**



Negativo



Positivo 1+



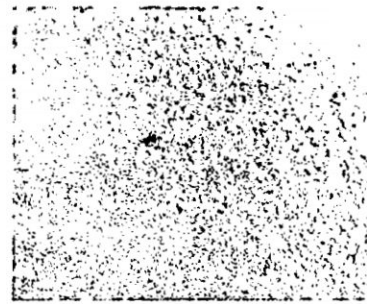
Positivo 2+



Positivo 3+



Positivo 4+



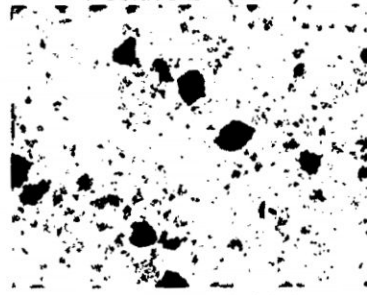
Negativo (100x)



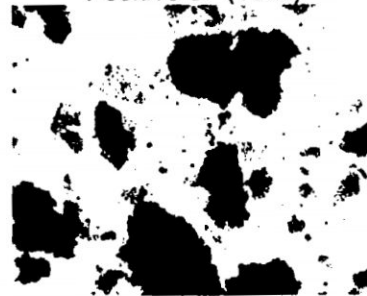
Positivo 1+ (100x)



Positivo 2+ (100x)

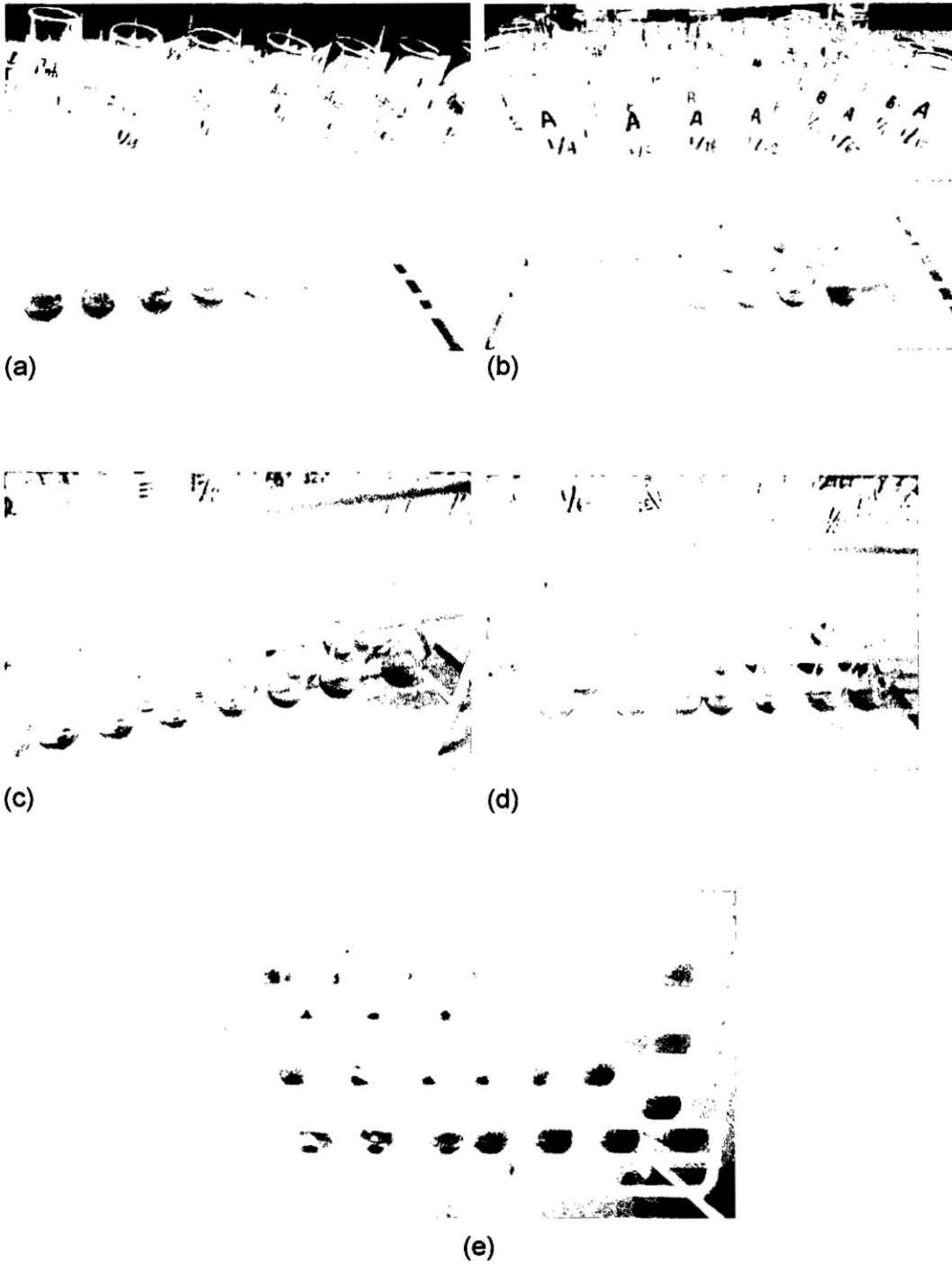


Positivo 3+ (100x)

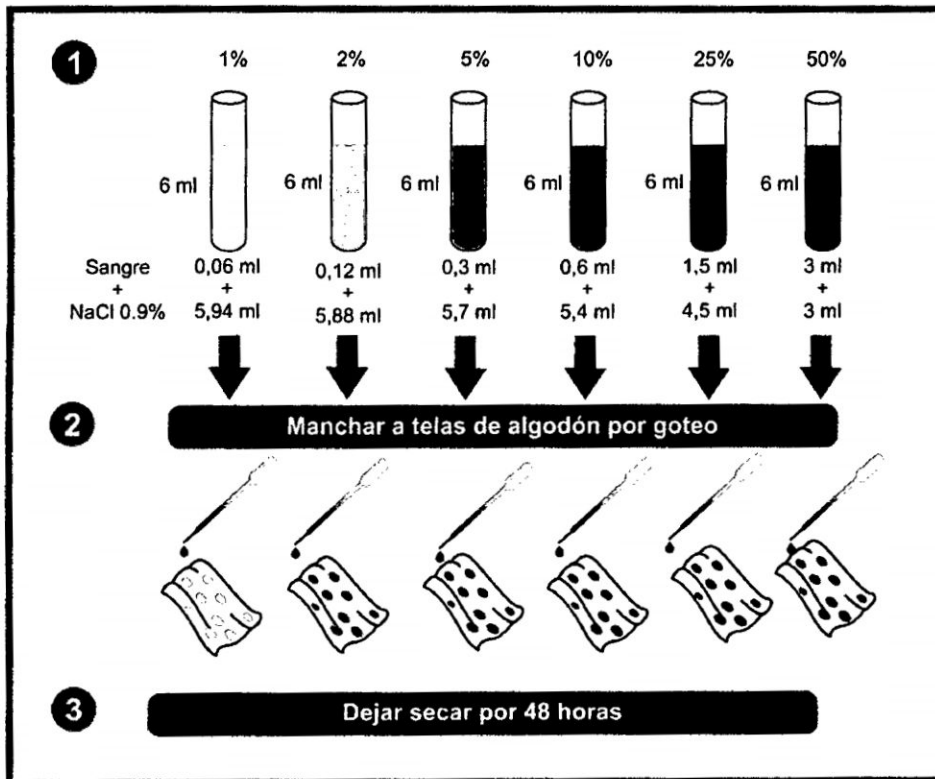


Positivo 4+ (100x)

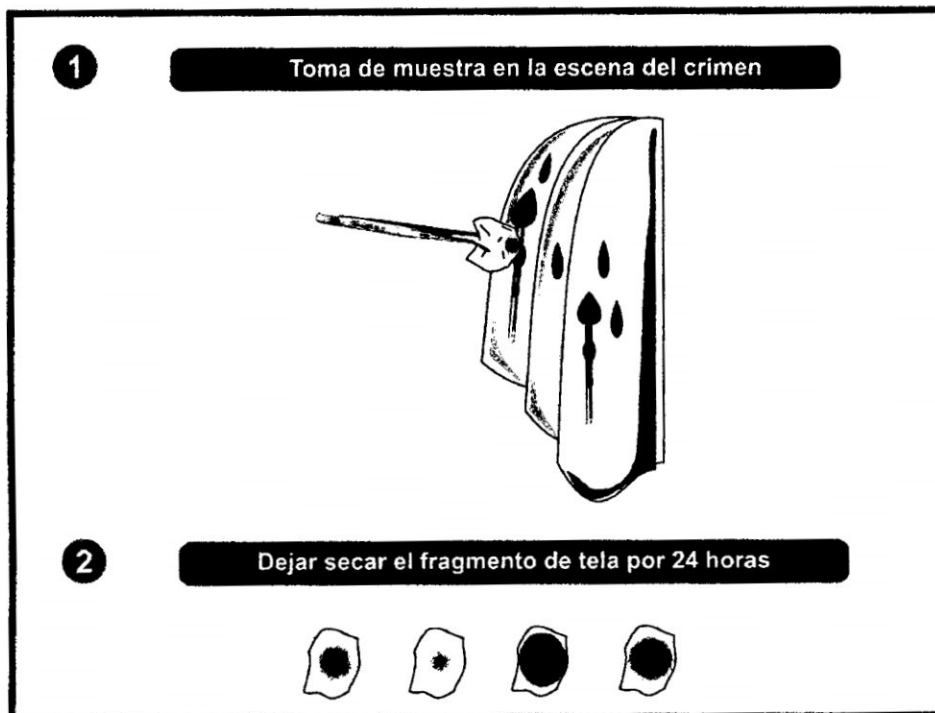
**ANEXO 11.** (a) Preparación de antisueros monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B, en diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128; técnica de Adsorción-elución modificado. (b) Tubos con antisueros diluidos enfrentados con hemáties al 2%, (c), (d) y (e) Formación del botón de hemáties luego de la centrifugación a 2500 rpm por 3 minutos.



**ANEXO 12. (a) Diluciones de la sangre a diferentes concentraciones. (b) Toma de muestra en la escena del crimen.**

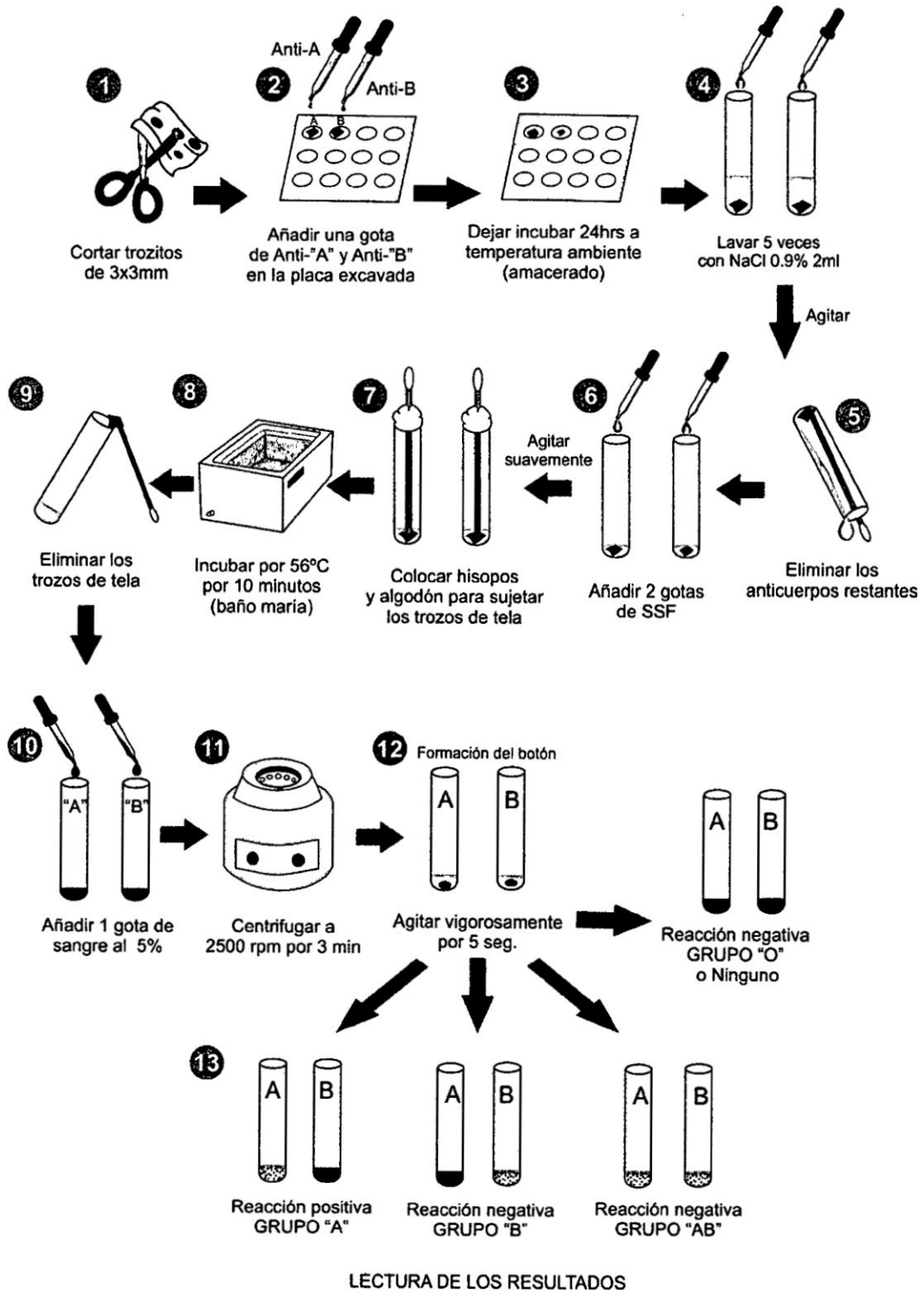


(a)

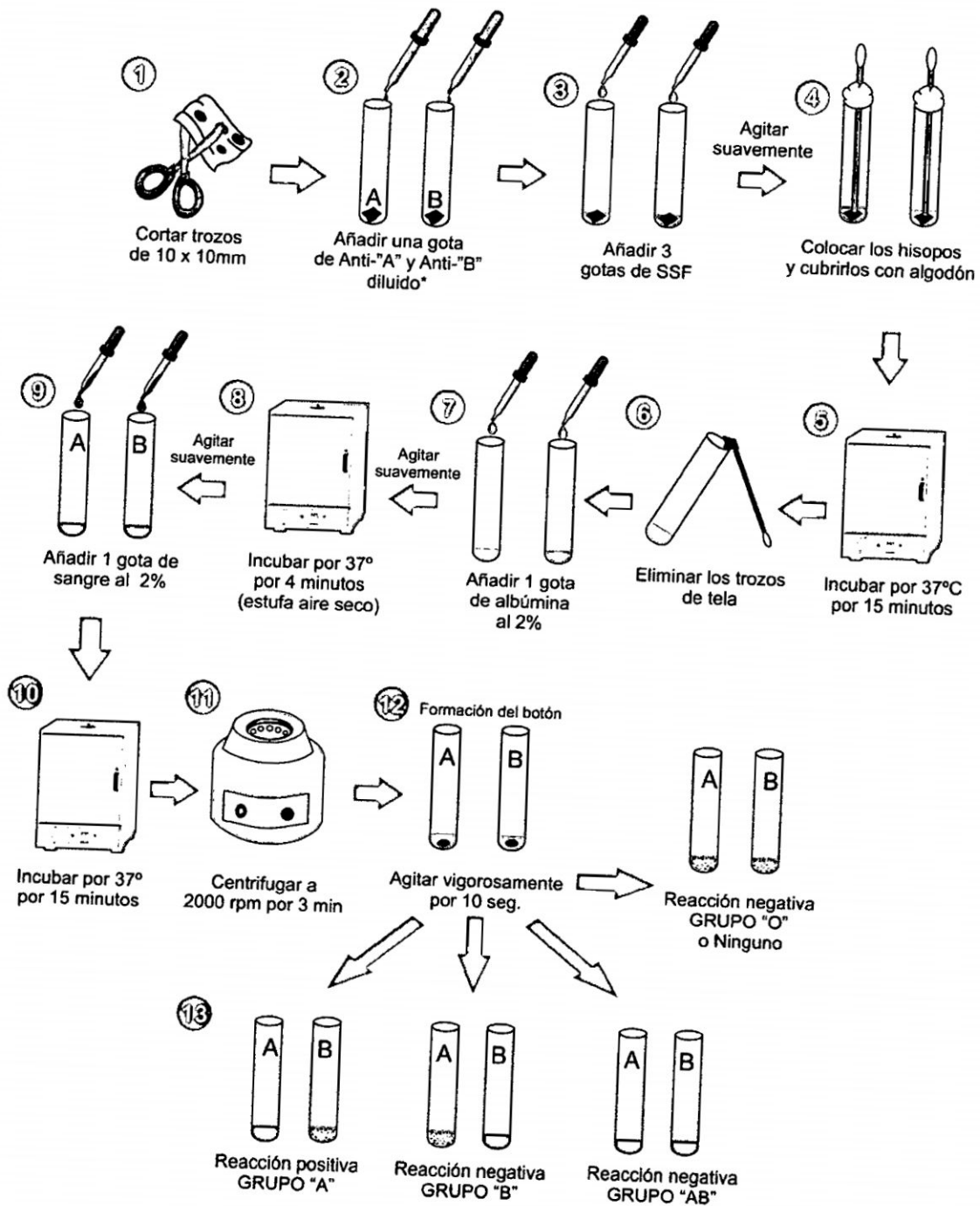


(b)

**ANEXO 13. Protocolo del procedimiento con la técnica de adsorción – elución**

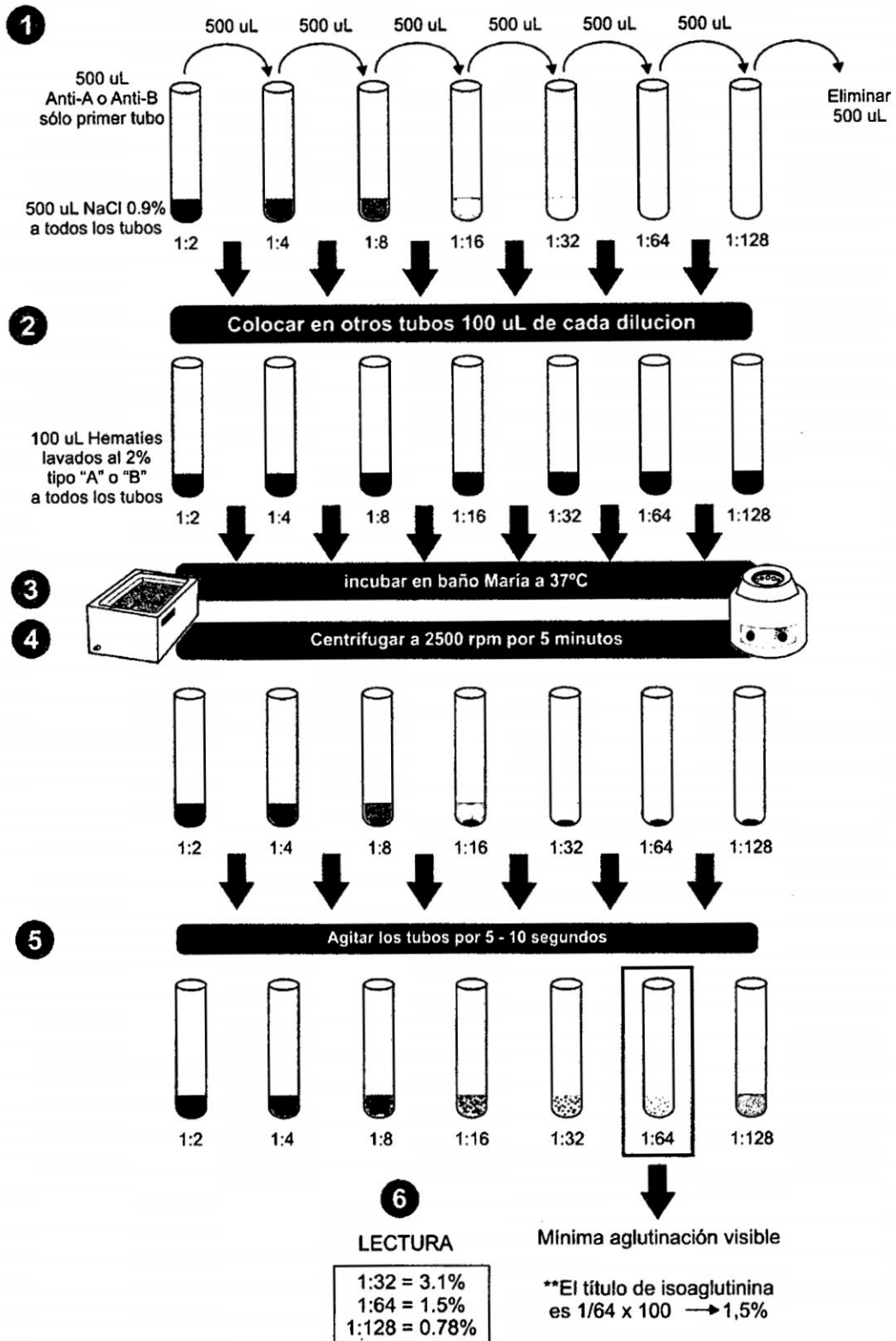


**ANEXO 14.** Protocolo del procedimiento con la técnica de adsorción-elución modificado.



LECTURA DE LOS RESULTADOS

**ANEXO 15. Protocolo del título de isoaglutininas de los anticuerpos monoclonales Biotec Anti-A y Anti-B.**



\*\* Todos los reactivos monoclonales anti-A y anti-B, varían la concentración de anticuerpos de fabricante en fabricante y de lote en lote del mismo fabricante, como también la exposición al medio ambiente a mayor tiempo.

- Colocar en un tubo 2 ml de SSF (solución salina fisiológica), luego eliminar 182 $\mu$ L del contenido y en su lugar añadir albúmina 22% líquido 182  $\mu$ L y homogenizar.

### 3. Cloruro de sodio 0.9%

- Pesar 9 gramos de cloruro de sodio
- Mezclar en 1 litro de agua destilada
- Autoclavar la solución

### 4. Glóbulos rojos lavados al 2%

- Centrifugar la sangre con anticoagulante por 5 minutos a 2 500 rpm.
- Aspirar el plasma con una pipeta Pasteur, luego llenar el tubo con NaCl 0.9%.
- Centrifugar por 5 minutos a 2 500 rpm, nuevamente aspirar la solución de cloruro de sodio, repetir el proceso 5 veces
- Tomar el sedimento eritrocitario según la ecuación de diluciones:

$$C_1 = 100\%; V_1 = ?$$

$$C_2 = 2\%; V_2 = 2 \text{ ml}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 2\% \times 2 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{2\% \times 2 \text{ ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 0,04 \text{ ml} \cong 40 \mu\text{L}$$

- Colocar en un tubo 2 ml de SSF (NaCl 0.9%), luego eliminar 40 $\mu$ L del contenido y en su lugar añadir sedimento eritrocitario 40  $\mu$ L y homogenizar.

### 5. Glóbulos rojos lavados al 5%

- Centrifugar la sangre con anticoagulante por 5 minutos a 2 500 rpm.
- Aspirar el plasma con una pipeta Pasteur, luego llenar el tubo con NaCl 0.9%.
- Centrifugar por 5 minutos a 2 500 rpm, nuevamente aspirar la solución de cloruro de sodio, repetir el proceso 5 veces
- Tomar el sedimento eritrocitario según la ecuación de diluciones:

$$C_1 = 100\%; V_1 = ?$$

$$C_2 = 5\%; V_2 = 2 \text{ ml}$$

## ANEXO 16. Preparación de reactivos y cálculos de las diluciones.

### 1. Diluciones anticuerpo anti-A y anti-B

- Datos obtenidos:

Título de isoaglutininas: anti-A = 1/64 equivale en porcentaje 1,5%

Título de isoaglutininas: anti-B = 1/32 equivale en porcentaje 3%

- Reemplazamos en la ecuación  $C_1.V_1 = C_2.V_2$ ; si se quiere preparar 2 mL para ambos antisueros:

**Dilución anti-A para 2 mL**

$$C_1 = 100\%; V_1 = ?$$

$$C_2 = 1,5\%; V_2 = 2 \text{ ml}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$
$$100\% \times V_1 = 1,5\% \times 2 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1,5\% \times 2 \text{ ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 0,03 \text{ ml} \cong 30 \mu\text{L}$$

**Dilución anti-B para 2 mL**

$$C_1 = 100\%; V_1 = ?$$

$$C_2 = 3\%; V_2 = 2 \text{ ml}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$
$$100\% \times V_1 = 3\% \times 2 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{3\% \times 2 \text{ ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 0,06 \text{ ml} \cong 60 \mu\text{L}$$

- Colocar en un tubo 2 ml de SSF (solución salina fisiológica), luego eliminar 30 $\mu$ L del contenido y en su lugar añadir **anti-A** y homogenizar.
- Colocar en un tubo 2 ml de SSF (solución salina fisiológica), luego eliminar 60 $\mu$ L del contenido y en su lugar añadir **anti-B** y homogenizar.

### 2. Albumina 2% líquido

- Realizar la dilución utilizando la ecuación  $C_1.V_1 = C_2.V_2$ ; según los datos obtenidos:

$$C_1 = 22\%; V_1 = ?$$

$$C_2 = 2\%; V_2 = 2 \text{ ml}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$
$$22\% \times V_1 = 2\% \times 2 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{2\% \times 2 \text{ ml}}{22\%}$$

$$V_1 = 0,182 \text{ ml} \cong 182 \mu\text{L}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 5\% \times 2ml$$

$$V_1 = \frac{5\% \times 2ml}{100\%}$$

$$V_1 = 0,1ml \cong \mathbf{100 \mu l}$$

Colocar en un tubo 2 ml de SSF (NaCl 0.9%), luego eliminar 100  $\mu$ L del contenido y en su lugar añadir sedimento eritrocitario 100  $\mu$ L y homogenizar.

ANEXO 17. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLE E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Determinación del grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" en manchas de sangre, Ayacucho 2015.</p>	<p>¿Cuál será la concentración de sangre y la antigüedad de manchas de sangre en telas que permitan aglutinaciones óptimas en la determinación de grupo sanguíneo "A", "B" y "AB"?</p>	<p><b>Objetivos generales</b></p> <p>Evaluar la concentración de sangre y la antigüedad de la mancha de sangre, óptimas que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", utilizando dos técnicas forenses.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conocer las concentraciones de sangre óptimas, que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" en telas manchadas de sangre, utilizando dos técnicas forenses.</li> <li>• Conocer la antigüedad de mancha de sangre en telas, que permitan determinar el grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", utilizando dos técnicas forenses.</li> </ul>	<p><b>Antecedentes</b></p> <p>En 1901, Landsteiner descubrió la existencia del sistema ABO.</p> <p>En 1925, el mismo Landsteiner, en colaboración con Miller, aporta el método clásico de adsorción para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO.</p> <p>En 1927, el método que es descrito por Wiener con el nombre de Técnica de Adsorción-Inhibición y utilizado tanto para el sistema A, B, O, como para los Antígenos Eritrocitarios M, N.</p> <p>En 1960, Kind introduce el método de Adsorción - elución que viene a abolir el tradicional de Adsorción - inhibición para determinaciones de los grupos ABO.</p>	<p><b>Variables</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentraciones de glóbulos rojos para la determinación de grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", en manchas secas de sangre.</li> <li>• Tiempo de exposición de glóbulos rojos para la determinación de grupo sanguíneo "A", "B" y "AB", en manchas secas de sangre.</li> </ul>	<p><b>Muestra</b></p> <p>Se consideró a 04 personas voluntarias que pertenecieran al sistema del grupo sanguíneo "A", "B" y "AB" de la ciudad de Ayacucho.</p> <p><b>Preparación de la muestra</b></p> <p>Se diluyeron las muestras de sangre: 1/2 (50%), 1/4 (25%), 1/10 (10%), 1/20 (5%), 1/50 (2%), 1/100 (1%).</p> <p>Se manchó por goteo 15 telas de algodón (color blanco) con dimensión de 5x5 cm, para cada uno de las diluciones y se dejó secar 48 horas.</p> <p><b>Procesamiento de las Técnicas forenses</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La primera técnica utilizada fue: técnica de adsorción – elución</li> <li>• La segunda técnica utilizada fue: técnica de adsorción-elución modificada.</li> </ul> <p><b>Análisis estadístico</b></p> <p>Regresión logística binaria.</p>