



**Análise de Sangue Humano Coletado de Diferentes Superfícies e
Substratos Através da Técnica Imunocromatográfica
Feca Cult One Step Test**

**Analyses of Human Blood Collected from Different Surfaces and Substrates
Using Immunochromatographic Technique Feca Cult One Step Test**

Ana Paula Secci de Lima*, Margaret Mitiko Inada Pereira

Instituto Paulista de Estudos Bioéticos e Jurídicos (IPEBJ), Ribeirão Preto, SP, Brasil

* Corresponding author. E-mail: anapaula_seccidelima@yahoo.com.br

Received 22 August 2017

Resumo. O sangue pode ser encontrado de diversas formas nos locais de crime: coagulado, seco, em manchas, esfregaços, e depositados em diferentes superfícies. A detecção e a confirmação do sangue com testes laboratoriais auxilia a polícia científica na identificação do criminoso, da vítima e na compreensão da dinâmica do fato. O Feca Cult One Step, um teste específico para detecção de hemoglobina humana, tem bastante utilidade no laboratório e também em cena de crime por apresentar praticidade e rapidez. Devido à alta sensibilidade desse teste, a pesquisa foi desenvolvida com o intuito de avaliar se algum fator poderia interferir no resultado e prejudicar a elucidação de um crime. Para a realização da técnica coletou-se sangue venoso de quatro doadores. Em seguida, os sangues doados foram depositados sobre vinte e quatro substratos diferentes (beterraba, gelatina em pó vermelha, suco artificial em pó, terra roxa, terra escura, madeira, asfalto, moedas (R\$ 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 e 1,00), chá-preto com canela, chá-verde, carne bovina, folha vegetal, areia, fumo de palheiro, tecido de jeans escuro, ferrugem, plástico com ímã, hipoclorito, detergente e alvejante). Devido à sensibilidade do teste imunocromatográfico utilizado, os resultados foram compatíveis com o esperado. No entanto, alguns testes apresentaram resultados falsos-negativos e falsos-positivos. Além desses resultados que prejudicam o desempenho do teste, erros técnicos na coleta das amostras, o contato

prolongado com agentes químicos e a diluição em excesso das manchas de sangue são interferentes que devem ser considerados ao utilizar o Feca Cult One Step.

Palavras-chave: Sangue; Feca Cult One Step Test; Criminalística.

Abstract. Blood can be found in various forms at crime sites: clotted, dried, stained, smeared and deposited on different surfaces. The detection and confirmation of blood with laboratory tests helps the scientific police in the identification of the criminal, victim, and the in the comprehension of the dynamics of facts. The Feca Cult One Step, a specific test for detecting human hemoglobin, is very useful in the laboratory and also for crime scenes because it is a practical and fast analysis. Due to the high sensitivity of this test, the research was developed with the purpose of evaluating if any factor could interfere in the result and affect the elucidation of a crime. For the technique, it was collect venous blood from four donors. Then donated blood was deposited on twenty-four different substrates (beet, red powder gelatin, artificial juice in powder, purple earth, soil, wood, asphalt, coins (R\$ 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 and 1.00), black tea with cinnamon, green tea, beef, leaf, sand, straw smoke, dark denim fabric, rust, plastic with magnet, hypochlorite, detergent and bleach). Due to the accuracy of the immunochromatographic test, the results were compatible with the expected results. However, some tests presented false-negative and false-positive results. In addition to these results that impair performance of the test, technical errors at the time of sample collection, prolonged contact with chemical agents, and excessive dilution of blood spots are interferences that should be considered when using Feca Cult One Step on identification of human blood.

Keywords: Blood; Feca Cult One Step Test; Criminalistic.

1. Introdução

O vestígio na cena do crime, após análise e confirmação do vínculo com o delito torna-se evidência material e tem grande valor probatório na ação penal, caso seja coletado e preservado corretamente¹. O sangue é um vestígio importante e pode ser encontrado de diversas formas na cena do crime. Devido à necessidade de confirmar se o sangue encontrado na cena de crime é humano, em 1999 o teste imunocromatográfico foi introduzido².

O Feca Cult One Stept, é um teste rápido e imunocromatográfico para identificação qualitativa de hemoglobina humana em fezes, através da visualização da cor no dispositivo ou tira. Esses testes utilizam anticorpo anti-hemoglobina humana que, quando aplicados em amostras de material biológico obtidos em investigação criminal, podem indicar a presença de sangue humano, mesmo em

amostras antigas, contaminadas ou em estado de putrefação³. O teste também é adequado para uso em material envelhecido e degradado, pois é sensível a uma variedade de insultos ambientais⁴.

A aplicação do teste na área forense só foi possível, após adaptação por pesquisadores que avaliaram a possibilidade de identificar o sangue em material corado. Esse experimento comprovou que o teste é robusto e adequado para a área forense³.

Existem diversos testes rápidos para a identificação de sangue humano, que podem ser usados em laboratórios e nas cenas de crime, por exemplo o Hexagon⁵ e o SERATEC PMB⁶. No entanto, no Brasil, o teste disponibilizado pela Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) para os peritos criminais é o Feca Cult One Step. Dessa maneira, o trabalho objetivou a investigação da sensibilidade e especificidade do teste Feca Cult One Step, quando o sangue encontrado é depositado em diferentes superfícies, no intuito de verificar reações que possa alterar os resultados para falso-positivos ou falso-negativos.

2. Métodos

2.1 Procedimentos técnicos

Nesta pesquisa foi utilizado o teste Feca Cult One Step para identificar a presença de sangue humano em 24 superfícies: carne bovina, chás, beterraba, gelatina em pó vermelha, suco em pó, asfalto, terras, madeira, vegetação, plástico com ímã, fumo de palheiro, jeans escuro, moedas, ferrugem, areia, hipoclorito, alvejante e detergente. No intuito de avaliar resultados falsos-positivos (indicando a presença de sangue quando na realidade não há), foi utilizada água destilada em contato com as superfícies citadas. Também utilizou-se sangue humano fornecido por quatro doadores para avaliar os resultados falsos-negativos (indicando que não há sangue quando existe esse elemento). Diferentes superfícies foram aplicadas na pesquisa de forma que os pesquisadores pudessem investigar se estes substratos se comportariam como interferentes na leitura final do teste.

Os substratos utilizados como superfície de contato com as amostras foram mantidos em respectivos beakers, cobertos com filme plástico e armazenados em local adequado, protegido da luz, umidade e calor, por um período de sete dias, de

modo que as manchas ficassem totalmente secas ou as gotas completamente misturadas.

Os componentes químicos utilizados, como: alvejante, hipoclorito e detergente, foram testados no mesmo dia, e também após uma semana.

2.2 Questões éticas

Esta pesquisa foi aprovada com o CAAE: 56953716.3.0000.558 pelo comitê de ética 5581 – Centro Universitário Estácio de Ribeirão Preto em 11/08/2016.

As amostras utilizadas para o desenvolvimento da pesquisa, são de alunos do cursos de pós graduação em Ciências Forenses do Instituto Paulista de Estudos Bioéticos e Jurídicos (IPEBJ). O sangue foi coletado somente após os quatro alunos voluntários lerem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

3. Resultados e discussão

Devido à sensibilidade do Feca Cult One Step, as amostras submetidas ao teste resultaram positivo para sangue humano, com exceção do chá- verde, ferrugem e carne bovina (Tabela 1).

Tabela 1: Representação das amostras submetidas ao teste, e seus respectivos resultados.

Superfícies de contato com sangue	Resultados
Beterraba	Positivo para sangue humano
Gelatina em pó vermelha	Positivo para sangue humano
Suco em pó	Positivo para sangue humano
Terra roxa	Positivo para sangue humano
Terra escura	Positivo para sangue humano
Madeira	Positivo para sangue humano
Moedas R\$ (0,05, 0,10, 0,25, 0,50 e 1,00)	Positivos para sangue humano
Chá-preto	Positivo para sangue humano
Folha vegetal	Positivo para sangue humano
Areia	Positivo para sangue humano
Fumo de palheiro	Positivo para sangue humano
Tecido de jeans escuro	Positivo para sangue humano
Carne bovina	Falso-negativo
Chá-verde	Falso-negativo

Asfalto	Positivo com fraca intensidade de reação na zona teste.
Plástico com ímã	Positivo com fraca intensidade de reação na zona teste.
Superfície enferrujada	Falso-negativo no primeiro teste
Hipoclorito, detergente e alvejante	Positivo com fraca intensidade de reação na zona teste e Falso-negativo após o período de sete dias

3.1 Carne bovina

A carne bovina que apresentou resultado falso-negativo e falso-positivo, após um intervalo de sete dias em contato do sangue e da água destilada com a carne.

Sawaya & Rolim⁴ descrevem que o excesso de hemoglobina livre em relação ao conjugado, causa o efeito “hook”. Esse efeito ocorre quando a hemoglobina livre se liga aos anticorpos imobilizados que não possuem o corante, portanto não é possível identificar a linha rosa do teste⁴ (Figura 1).

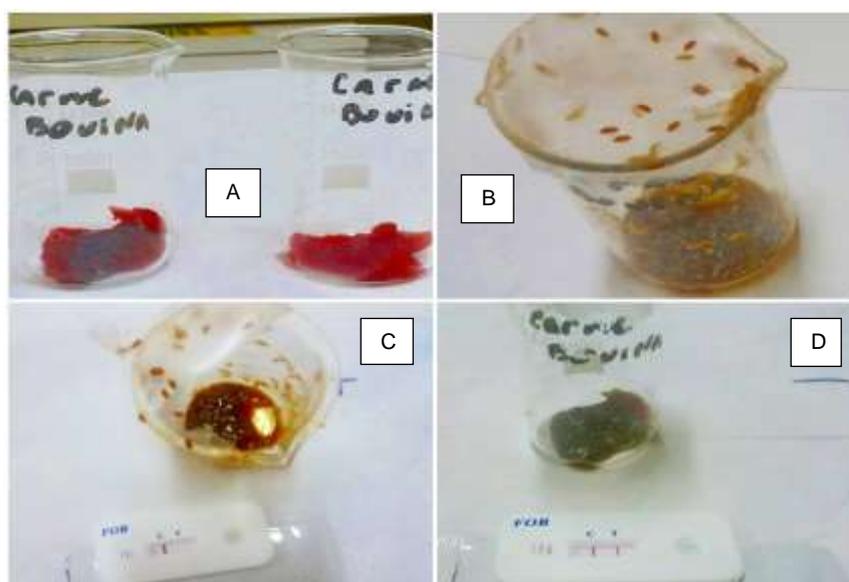


Figura 1. A) Carne bovina com amostra sanguínea e com água destilada, antes do teste. B) Amostra com sangue humano contaminada com larvas após o período de sete dias. C) Carne bovina com sangue humano e contaminada com larvas, resultando em falso-negativo. D) Carne bovina que continha água, em estado de decomposição e com proliferação de larvas, resultando em falso-positivo.

3.2 Chá-verde

O chá-verde após sete dias de intervalo em contato com as amostras apresentou contaminantes representados pela proliferação de fungos. Devido à presença de fungos, o procedimento foi repetido com o chá fresco sem esse intervalo de tempo de sete dias e a hemoglobina foi detectada pelo teste.

Sawaya & Rolim⁴ relatam que a presença de microrganismos não alteram o resultado do teste. No entanto, foi observado resultado falso-negativo e falso-positivo. Esses resultados podem ser esclarecidos no futuro por meio de novos experimentos.

3.3 Madeira, asfalto e plástico com ímã

Quando se trata de superfícies aderentes e não aderentes, que são conceitos estudados dentro da perícia, utilizamos: asfalto (aderente), madeira (aderente)⁷ e plástico com ímã (não aderente). Como relatado na Tabela 1 todas tiveram resultados positivos para sangue humano. A madeira por se tratar de uma superfície que tem uma aderência maior quando em contato com a amostra, apresentou na área teste uma coloração mais forte pela quantidade maior de sangue captado pelo teste.

3.4 Moedas

Yoshitake *et al.*⁸ relataram em sua pesquisa que o cobre presente nas moedas, quando em contato de aproximadamente hora com a solução de azida de sódio, resulta em falso-positivo no teste. Já moedas feitas de aço inoxidável e livres de cobre apresentam resultado negativo.

As moedas testadas no presente trabalho, por possuírem ligas metálicas e diferentes composições – inclusive cobre, – poderiam, em princípio, interferir com a solução de azida de sódio do tubo coletor existente no kit, resultando em falso-positivo. No entanto, não obtivemos resultados falsos-positivos com as moedas R\$0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00.

Com o intuito de avaliar se a azida de sódio em poucas quantidades no tubo coletor reage com o cobre em um intervalo de tempo menor que o utilizado pelos pesquisadores, foi aplicado o teste. Devido ao pouco tempo de reação entre o cobre e a azida de sódio, o sangue foi detectado, demonstrando que se não houver

contato prolongado entre as moedas e a solução de azida de sódio da salina tamponada do kit, a interpretação do resultado não será prejudicada.

A aplicação do Feca Cult One Step com as respectivas moedas, demonstrou que é interessante saber e respeitar o tempo de execução e interpretação de qualquer teste rápido, para minimizar erros na leitura dos resultados.

3.5 Superfície enferrujada

A coleta da amostra em superfície enferrujada resultou em falso-negativo possivelmente pela falta de aderência do sangue nesse tipo de superfície. O teste foi aplicado novamente após coletar uma maior quantidade em diferentes pontos⁹ da amostra e do substrato, e a hemoglobina humana foi identificada (Figura 2).

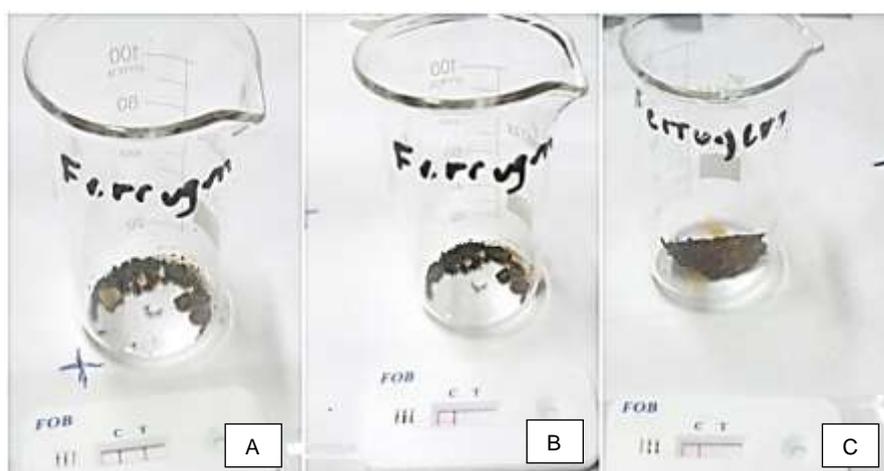


Figura 2. A) Resultado encontrado depois de coletar três partes distintas da amostra. B) Resultado falso-negativo. C) Ausência de sangue humano.

3.6 Especificidade e sensibilidade

O teste apresentou sensibilidade (detecção dos verdadeiros positivos) e especificidade (detecção dos verdadeiros negativos) ao detectar sangue humano nos substratos: chá-preto, folha de vegetal, areia, fumo de palheiro, gelatina, suco, terra roxa, terra escura, tecido de jeans escuro e a madeira, comprovando que nenhum dos componentes presentes nestes substratos alteram os resultados do teste.

3.7 Agentes químicos

Alguns testes presuntivos como o Luminol, pode ocasionar em resultados falsos-positivos quando reagem com hipoclorito de sódio. No entanto, o Feca Cult One Step, consegue detectar sangue humano mesmo quando este se encontra diluído¹⁰. De acordo com Almeida¹¹ o contato do sangue com alguns alvejantes prejudica o desempenho do teste. Esse critério tem relação com a presença de água na composição dos detergentes e alvejantes, acarretando em uma diluição maior do sangue e conseqüentemente identificada uma concentração menor da hemoglobina humana.

Este teste tem alta sensibilidade detectando 0,05 µg/ ml da amostra, e mesmo quando as amostras se encontram diluídas, quantidades significantes da hemoglobina são recuperadas¹⁰. No entanto, se houver aumento da diluição e do tempo de exposição, a linha positiva na zona de reação do teste fica fraca, dificultando a interpretação do resultado.

Dessa forma, para avaliar o fator tempo de exposição, diluímos apenas três gotas de sangue com os agentes químicos, e aplicamos o teste. E mesmo com menos de um minuto de contato, o teste detectou pouca quantidade de hemoglobina, resultando em uma faixa rosa mais fraca na zona de reação T do teste (Figuras 3, 4 e 5).

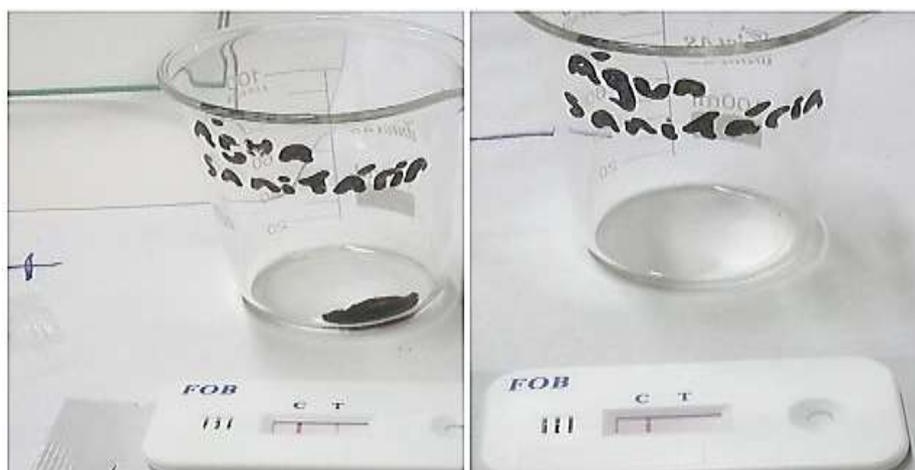


Figura 3. Água sanitária com presença de sangue humano à esquerda e ausência de sangue humano à direita.

O tempo prolongado em que o sangue foi exposto em contato com os substratos do presente trabalho, possibilitou a degradação da hemoglobina pelos

agentes químicos e diminuição da concentração de hemoglobina resultando em falso-negativo¹¹.

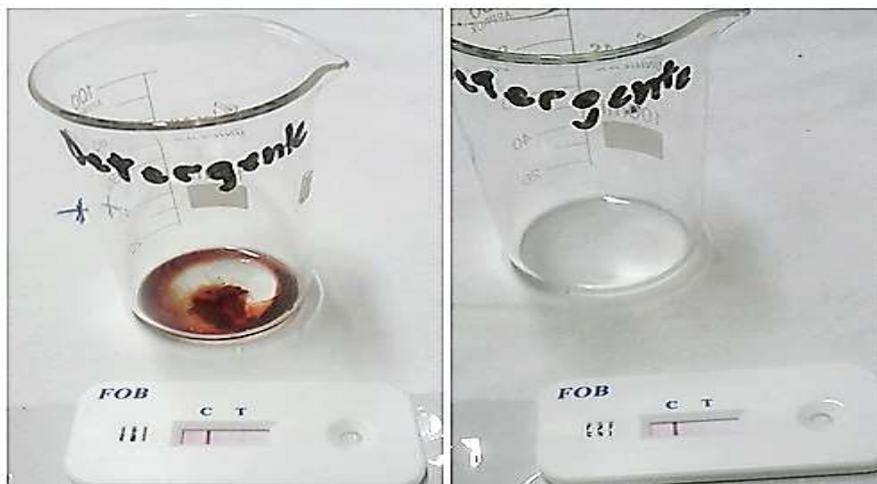


Figura 4. Detergente com presença de sangue humano à esquerda e ausência de sangue humano à direita.

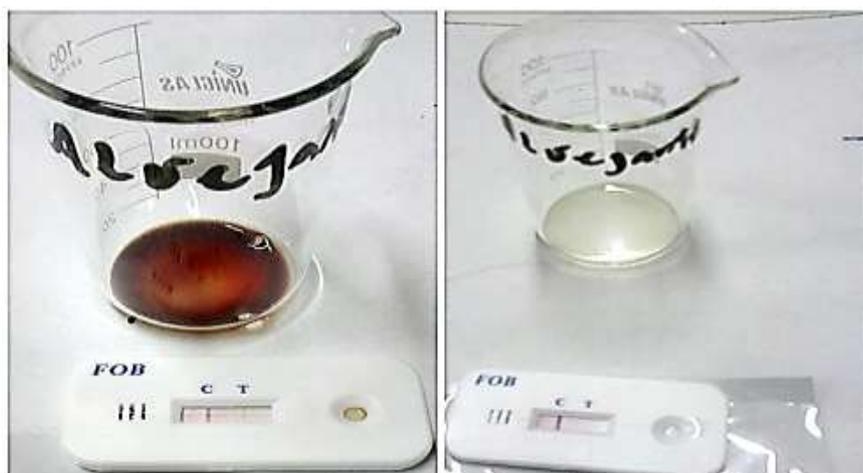


Figura 5. Alvejante com presença de sangue humano à esquerda e ausência de sangue humano à direita.

Neste trabalho não foi possível detectar presença de hemoglobina humana após uma semana de contato do sangue com o substrato, resultando em falso-negativo. Assim, os testes foram repetidos sem tempo de espera.

4. Conclusão

Os laboratórios forenses necessitam de testes precisos que garantam sensibilidade e especificidade, porque as análises laboratoriais são minuciosas, e

a área forense não só depende de testes robustos, mas também de profissionais que saibam interpretar os resultados identificados.

Este estudo nos alertou que quantidades muito pequenas das amostras, submetidas ao Feca Cult One Step teste, exposição do sangue por período prolongado com água sanitária, detergente e alvejante, excesso de hemoglobina livre em relação ao conjugado e a diluição excessiva do sangue no momento da coleta, tanto no local, como no momento do teste, fornecem resultados falso-negativos. Em contrapartida, observou-se também que na presença de larvas e fungos obtém-se resultados tanto falso-negativos como falso-positivos.

É importante lembrar que não só a forma como se coleta, como também a conservação dos materiais influencia no resultado real do teste, fornecendo resultados falso-negativos e falso-positivos.

Recomenda-se dessa forma, tanto no local de crime, como na bancada do laboratório, não utilizarem excesso de substâncias para diluir a amostra sanguínea encontrada em estado seco, e recolher a amostra em diferentes locais.

Além disso, os peritos responsáveis pela coleta, pelo recebimento e pela aplicação dos testes nos laboratórios devem estar cientes que a superfície contendo o material sanguíneo deve ser conservada corretamente.

Referências

1. Ferrari Júnior E, Ramos FB. Exames Presuntivos para Detecção de Sangue. Revista Jus Navigandi. [Acesso em: 20 ago.2012];17: {s.p}. Disponível em: <https://jus.com.br/artigos/21490/exames-presuntivos-para-deteccao-de-sangue>.
2. Hochmeister MN, Budoule B, Sparkes R, Rudin O, Gehriq C, Thali M, et al. Validation Studies of an Immunochromatographic Human Blood. Rev. Journal of Forensic Sciences.1999;44(3):597-601.
3. Longo P, Dias Filho CR, Valadares MPO, Alonso EC, Gonçalves SPP, Bittencourt, EA. Avaliação Comparativa de Teste Imunocromatográfico para Identificação Forense de Sangue Humano. Rev. Brasileira de Criminalística. 2011;1(1):16-21. <https://doi.org/10.15260/rbc.v1i1.11>
4. Sawaya MCT, Rolim MRS. Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório. 2. ed. Curitiba: Juruá; 2009. 230 p.
5. Monteiro IVDP. Vestígios Hemáticos no Local de Crime sua Importância Médico Legal. Porto. Dissertação [Mestrado]-Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; 2010.

6. Holtkotter H. Dias Filho LB. Schwender K. Stadler C. Vennemann M. Pacheco AC. Roca G. Forensic Differentiation Between Peripheral and Menstrual Blood in Cases of Alleged Sexual Assault-validating and Immunochromatographic Multiplex Assay for Simultaneous Detection Of Human Hemoglobin and D-dimer. *Int J Legal Med.* 2017;4: 1-8.
7. Miranda EG. De Paula WX. E Santos RD. H Melani RF. Detecção de Manchas de Sangue pelo Luminol Onde Houve Entintamento das Paredes – Estudo de Caso. *Rev. Brasileira de Criminalística.* 2016;5:14-17. <https://doi.org/10.15260/rbc.v5i1.119>
8. Feca Cult One Step. Teste rápido. Produzido por Inlab diagnóstica. Diadema: Interlab, 2008. Bula do teste. Disponível em: <http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/1489449073aab20f0.pdf>.
9. Yoshitake NM. Coelho LB. Resende GSJ. Bizo HSD. Correa JF. Lima PSVG et al. Resultado falso-positivo para sangue humano pela ação de interferência química do cobre em teste imunocromatográfico. *Rev. Brasileira de Criminalística.* 2015;4:2-7.
10. Oliveira WMD, Queiroz PRM. Reagentes utilizados na detecção de manchas de sangue. In: VI Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Latu Senu da Puc Goiás; 2011 out 17-21; Goiânia, Brasil.Goiânia: Puc Goiás; 2011.
11. Almeida JPD. Influência dos Testes de Triagem para Detecção de Sangue nos Exames Imunológicos e de Genética Forense. Porto Alegre. Dissertação [Mestrado]- Universidade Católica do Rio Grande do Sul.