

Estudo comparativo do teste imunocromatográfico para detecção de sangue humano utilizado em análises clínicas com aplicação na biologia forense

A.C. Vaurek ^{a,*}, J.D.P. Cidin-Almeida ^a, L.M. Kraieski ^a, C.G. Resende ^b, L.B.S. Heinen ^{a,c}

^a Centro Universitário de Várzea Grande, Várzea Grande (MT), Brasil

^b Diretoria Metropolitana de Laboratório Forense. Perícia Oficial e Identificação Técnica (POLITEC), Cuiabá (MT), Brasil

^c Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês, São Paulo (SP), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: amandaczarnobai@gmail.com. Tel.: +55-65-99287-5400

Recebido em 00/00/2000; Revisado em 00/00/2000; Aceito em 00/00/2000

Resumo

No laboratório de biologia forense, o teste para detecção de hemoglobina humana é realizado através do ensaio imunocromatográfico, sendo que, este teste fora, a princípio, desenvolvido para pesquisa de sangue oculto em análises clínicas com o intuito de constatar a presença de hemoglobina em amostras de fezes. Em virtude disso, devido à carência de informações em relação ao uso desta técnica, o objetivo do presente estudo é demonstrar as diferenças e similaridades sobre a aplicabilidade do teste imunocromatográfico na rotina de laboratórios clínicos e forenses, bem como, seus princípios, sensibilidade, especificidade, interferentes e como esta metodologia foi validada e adaptada pelos laboratórios forenses. Para isto, foi realizado uma revisão de literatura baseada em artigos científicos e trabalhos disponíveis em base de dados do Google Acadêmico, PubMed, SciELO e Revista Brasileira de Criminalística, além de livros disponíveis na biblioteca física e sites especializados com produções relacionadas ao tema. Estudos e pesquisas comprovaram que esta técnica pode, de fato, ser aplicada na perícia criminal, mesmo que apresente alguns interferentes, são testes de fácil execução, rápida interpretação, sensíveis e específicos em ambas as áreas.

Palavras-Chave: Perícia criminal; hemoglobina humana; sangue oculto; teste rápido; exames forenses.

Abstract

In the laboratory of forensic biology, the test for the detection of human hemoglobin is executed through an immunochromatographic assay, which was initially developed for the investigation of occult blood in clinical analyzes in order to verify the presence of hemoglobin in stool samples. Therefore, due to the lack of information about the use of this technique, the objective of the present study is to demonstrate the differences and similarities on the applicability of the immunochromatographic test in the routine of clinical and forensic laboratories, as well as its principles, sensitivity, specificity, interferences and how this methodology was validated and adapted by forensic laboratories. For this purpose, a literature review was done based on scientific articles and works available in the Google Scholar database, PubMed, SciELO and Revista Brasileira de Criminalística, in addition to books available in the physical library and specialized websites with productions related to the theme. Studies and research have proven that this technique can, in fact, be applied in criminal investigations, even causing some interferences, they are tests of easy execution, quick interpretation, sensitive and specific in both areas.

Keywords: Criminal expertise; human hemoglobin; occult blood; rapid test; forensic examinations.

1. INTRODUÇÃO

Em uma cena de crime, o sangue é o principal vestígio biológico a ser encontrado e pode se apresentar de diversas formas, estando em sua forma líquida ou seco nas vestes da vítima, por exemplo [1]. A análise de sangue fornece informações importantes para resolução

de casos periciais, dando o entendimento da dinâmica do crime, ou, a partir dos dados genéticos da vítima e de um possível suspeito, vinculando estes a um local de crime [2].

O objetivo da análise de vestígios de sangue em biologia forense é confirmar se tais amostras realmente contêm hemoglobina humana para que então, sejam

aconditionadas para futuro confronto genético. O teste confirmatório de detecção de hemoglobina humana é realizado através do ensaio imunocromatográfico, sendo que, a princípio, fora desenvolvido para pesquisa de sangue oculto com o intuito de constatar a presença de hemoglobina em amostras de fezes para o diagnóstico de câncer colorretal, tornando-se amplamente utilizado em laboratórios clínicos [3, 4].

Tal metodologia empregada nos laboratórios clínicos para identificação qualitativa de sangue humano foi adaptado para as análises periciais através de estudos e pesquisas, no qual comprovaram que esta técnica pode ser aplicada para a detecção da hemoglobina em amostras forenses. Dessa forma, os testes imunocromatográficos passaram a ser implementados na perícia criminal no ano de 1999 [1]. Inicialmente, o teste foi introduzido em alguns laboratórios forenses da Alemanha e da Suíça, provando ser útil na confirmação da existência de hemoglobina nas amostras periciais [5].

Devido a rapidez do resultado e facilidade de aplicação, o ensaio imunocromatográfico tornou-se um método de extrema importância para a elucidação de crimes envolvendo fluídos corpóreos. Deste modo, é primordial que os testes sejam constantemente aprimorados para a finalidade proposta e realizados por peritos com capacidade técnica adequada [2].

No entanto, quando a amostra estiver em contato com algumas superfícies ou materiais, podem ocasionar resultados falso-positivos ou falso-negativos, devido estes testes serem fabricados propriamente para outra finalidade [1]. Um dos interferentes que influencia na análise de sangue é o cobre, no qual reage com a azida de sódio (NaN₃) presente na salina tamponada que compõe os kits dos testes, gerando um resultado falso-positivo para presença de sangue humano [6]. Além da interferência química do cobre, existe uma divergência na literatura tratando-se sobre a interferência que o reagente luminol causa nesses testes. O luminol é um exame presuntivo que emite quimiluminescência ao entrar em contato com o sangue e este ser exposto à luz ultravioleta, sendo amplamente utilizado quando não é possível visualizar as manchas de sangue a olho nu [7].

Portanto, por motivo de carência de informações em relação ao uso dos testes imunocromatográficos fabricados para identificar a presença de sangue oculto em fezes, no qual, também são utilizados na perícia criminal, o presente estudo tem como objetivo demonstrar as diferenças e similaridades sobre a aplicabilidade desta técnica na rotina de laboratórios clínicos e forenses, bem como seus princípios, sensibilidade, especificidade, interferentes e como esta metodologia foi validada e adaptada pelos laboratórios forenses. O estudo foi constituído através de uma revisão da literatura existente, fornecendo alto embasamento teórico sobre o assunto proposto.

2. METODOLOGIA

2.1. Tipo de estudo e base de dados

O presente estudo é uma revisão bibliográfica descritiva e foi elaborado a partir de uma pesquisa baseada em artigos científicos e trabalhos disponíveis em bases de dados como Google Acadêmico, SciELO, PubMed e Revista Brasileira de Criminalística. Além disso, também foram utilizados livros disponíveis na biblioteca física e sites especializados que possuem produções relacionados ao tema.

2.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos livros, artigos, dissertações e teses escritos em língua portuguesa e inglesa, publicados dentre o período de 1999-2019, tendo como descritores: “perícia criminal”; “biologia forense”; “sangue oculto nas fezes”; “testes imunocromatográficos”; “sangue humano”; entre outros.

Como critério de exclusão ficou estabelecido as publicações fora do período de abrangência e que não possuem relevância científica ou não condizem com a proposta central apresentada.

2.3. Aspectos éticos

Para este tipo de estudo não há necessidade de análise por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), segundo o art. 1º, parágrafo único, incisos V e VI do regulamento estabelecido na Resolução CNS-MS nº 510 de 2016.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste de sangue oculto nas fezes

O teste de sangue oculto nas fezes tem como objetivo auxiliar no diagnóstico laboratorial de câncer de cólon e de reto. O câncer de uma forma geral, é caracterizado como problema de saúde pública no Brasil, vindo a ser a segunda maior causa de mortes no país. Dentre os tipos mais comuns de câncer, destaca-se o Câncer Colorretal (CCR), que atinge ambos os sexos de maneira silenciosa e agressiva quando descoberto tardiamente. De acordo com Harb-Gama, em 2017, o estadió em que a doença é diagnosticada torna o tratamento mais eficaz, aumentando assim as chances de cura. Isso reforça a preocupação com o rastreamento e a pesquisa preventiva na população mais suscetível, desta maneira, este exame não deve ser um método invasivo, garantindo a facilidade na execução e simplicidade para o paciente a ser analisado [8].

Com a finalidade de evidenciar possíveis lesões provenientes de processos oncogênicos, o teste

imunocromatográfico de pesquisa de sangue oculto nas fezes foi desenvolvido. Este procedimento é recomendado para investigar a presença de hemoglobina nas fezes, sendo este o quadro clínico característico de lesões no cólon e reto, além de sinais de úlceras, colite e outros tipos de lesões no intestino grosso. Ao utilizar anticorpos específicos que atuam contra a hemoglobina presente nas amostras de fezes, é possível detectar a presença ou não de sangue [9].

Freitas explica que o teste imunocromatográfico tem a capacidade de detectar até 0,006 miligramas de hemoglobina humana por grama de fezes, tornando-o muito mais sensível quando comparado a outras metodologias de análise como o teste de guaiaco e a reação de benzidina [9]. A reação de guaiaco é um teste colorimétrico baseado na atividade da pseudoperoxidase que a porção da hemoglobina exerce, isso reage de forma a causar oxidação em um composto fenólico chamado de ácido alfa guaiconônico através da reação do peróxido de hidrogênio, formando assim, uma estrutura quinona, que são compostos químicos caracterizados pela presença de anéis quinonóidicos, encontrados na flora intestinal. Se houver presença de sangue nas fezes, é visível uma coloração azulada ou azul esverdeada [4, 10]. Nesta metodologia, há necessidade de uma dieta rigorosa a fim de evitar falso-positivos, pois alimentos como carne vermelha, legumes e verduras como rabanete, tomate, couve-flor, brócolis e nabo podem conter peroxidase e tornar o teste positivo. Sua capacidade de determinar hemoglobina nas fezes é de 0,3 miligramas de hemoglobina por grama [4].

A reação de benzidina, também conhecido como Adler-Ascarelli, tem o mesmo princípio que o teste de guaiaco, assim como a necessidade de uma dieta alimentar. Nesta técnica, as fezes são espalhadas sob um papel de filtro, adiciona-se duas gotas de água oxigenada sobre o esfregaço e duas gotas de benzidina, caso for observado a coloração azulada, confirma-se a presença de sangue. Ademais, outra técnica muito utilizada pelos laboratórios clínicos no Brasil e que também possui o mesmo princípio que a reação de guaiaco, é o reagente Kastle-Meyer [10]. A diferença é que quando a hemoglobina entra em contato com a água oxigenada, manifesta uma coloração avermelhada, resultando na positividade da reação. Tendo em vista as técnicas colorimétricas apresentadas quando comparadas ao teste imunocromatográfico, percebe-se maior eficiência na imunocromatografia, visto que, não exige dieta e o teste apresenta valores de detecção mais sensíveis em concentrações mais baixas [4, 10].

Resultados positivos nos testes imunocromatográficos requerem confirmação através de exames mais invasivos como a colonoscopia, que tem como desvantagem a dor e o desconforto testemunhado pelos pacientes. Tal procedimento exige sedação, analgesia, jejum e preparo

do intestinal. Sendo assim, Borges comprovou a eficácia dos testes laboratoriais de sangue oculto no rastreamento de câncer colorretal em pacientes pré-dispostos ou com maior taxa de incidência, permitindo que estes pacientes que estão em fase de investigação, ainda não confirmada, não precisem se submeter a um exame tão agressivo [11]. Além disso, a colonoscopia é associada ao risco de perfuração, embora as chances sejam de apenas cerca de 0,9%, e a dificuldade na visualização de todo o cólon, tornando o exame insuficiente ou incompleto por obstrução intestinal em 5% a 15% dos casos [12].

Em contrapartida, alguns estudiosos diferem suas abordagens clínicas no que se refere a investigação do CCR. Acreditando ser a colonoscopia a única forma de se detectar e diagnosticar o problema em questão, Dias e colaboradores exemplificam que, o teste imunocromatográfico é indeterminante, uma vez que, possíveis lesões causadas por hemorroidas ou leves sangramentos simples, induzem ao erro nos pacientes mais jovens, sendo crucial e de extrema importância, o diagnóstico precoce para um melhor resultado na abordagem terapêutica [13].

O Feca Cult One Step Test[®], da INLAB Diagnóstica, é frequentemente utilizado na rotina clínica para constatação de sangue oculto em fezes, seu dispositivo é composto por uma membrana, contendo anticorpos anti-hemoglobina humana na área de linha teste (T) e anticorpo de cabra anti-camundongo na área de controle (C). Um revestimento almofadado com anticorpo anti-hemoglobina humana conjugado de ouro coloidal é colocado no final da membrana. A amostra é então diluída em uma solução salina tamponada fornecida pelo kit. Através da ação de capilaridade, a solução é depositada no poço e a amostra começa a percorrer pelo dispositivo. Ao migrar, uma linha se tornará visível, indicando que houve reação com o complexo de anticorpos e a hemoglobina humana presente na amostra. Caso contrário, o teste é considerado negativo. Para que haja confiabilidade, o teste deverá, obrigatoriamente, apresentar a linha controle visível, certificando que o teste está apto [14].

O kit Imuno-Rápido Sangue Oculto Fecal[®] da WAMA Diagnóstica, combina anticorpos monoclonais com anti-hemoglobina humana, por conta disso, apresenta ótima sensibilidade e especificidade. Baseando-se no mesmo princípio e metodologia, os kits mencionados são empregados na rotina laboratorial, divergindo apenas na questão de preço e fabricante [15].

Para a realização do teste, a coleta deve ser feita em frasco próprio, seco e limpo, além disso, recomenda-se que, seja realizada três dias após, o período menstrual e caso o paciente se queixar de problemas relacionados a hemorroidas sangrentas ou sangue via uretral ao urinar. Estas precauções servem para evitar falso-positivos que induzem a uma conduta errônea, assim como, alguns

medicamentos também devem ser evitados, por causarem irritações e sangramentos internos [14].

Ao executar o exame, deve-se utilizar a haste descartável oferecida pelo próprio kit para recolher uma porção da amostra, após isso, agitar vigorosamente a fim de homogeneizar as fezes com a salina tamponada. Despejar de 4 a 6 gotas da suspensão no poço indicado no dispositivo e aguardar 5 minutos. Deve ser descartado imediatamente após o uso e em local apropriado [14].

O desempenho do teste Feca Cult® da INLAB Diagnóstica mostra-se sensível e específico para hemoglobina humana, uma vez que, seus testes desempenharam resultados confiáveis ao analisar amostras já conhecidas mantendo a coerência tanto para os negativos, quanto para os positivos, onde 55 amostras foram positivas e 210 amostras negativas, a endoscopia digestiva baixa confirmou, posteriormente, a doença colorretal para os casos positivos, além de 2 casos negativos, sendo estes classificados como falso-negativos. Em relação ao teste de guaiaco, o imunocromatográfico teve resultados melhores [14].

Dessa forma, o exame de sangue oculto nas fezes abrange metodologias diversificadas e se mostra eficiente em sua grande maioria no âmbito laboratorial clínico. Por esse motivo, estes testes vêm sendo aplicados na perícia criminal para identificar a presença de sangue humano e estudos minuciosos estão realizados para comprovar seu grau de aproveitamento.

3.2. Detecção de sangue humano nas análises forenses

As amostras de sangue mais comumente encontradas em investigações periciais estão envolvidas em locais de crimes violentos. A partir da morfologia (como estas se apresentam) e sua distribuição naquele ambiente, é possível caracterizar o padrão das manchas, permitindo que, tais padrões sejam ferramentas para reconstruir os eventos físicos que as originou, fornecendo valiosos informes sobre a ocorrência e preservação do local. Ademais, através de exames genéticos das manchas de sangue, consegue-se identificar o autor do delito [16].

Quando são encontradas manchas de sangue em um local de crime, seja em algum objeto ou em superfícies, os quesitos primários a serem respondidos pelo perito oficial criminal são: “o material apresenta vestígio de sangue?”, “É sangue humano?”, dessa forma, a identificação de sangue é o primeiro passo para a elucidação de um crime. Esta identificação é realizada de duas formas: a partir dos testes de orientação ou presuntivos, os quais apontam a probabilidade do material ou do local conter sangue e pelos testes de certeza ou confirmatórios, que confirmam a presença de sangue humano. Tanto nos exames presuntivos quanto nos confirmatórios, as reações ocorrem em torno da hemoglobina presente nos eritrócitos [17].

Os exames presuntivos geralmente são aplicados quando não é permitido a visualização dos vestígios sanguíneos a olho nu. Sendo assim, são utilizados como esta metodologia o luminol e a benzidina (reagente de Adler-Ascarelli, também utilizado na detecção de sangue oculto em análises clínicas). Ambos os testes baseiam-se na reação de uma substância indicadora por um agente oxidante, catalisada na presença de sangue, tendo como produto final a emissão de luminescência ou a geração de um composto corado [18].

No início das técnicas laboratoriais forenses, a confirmação da presença de sangue era realizada mediante a formação de cristais de derivados do grupo heme da hemoglobina insolúveis em água. Estes testes de cristais foram descritos e validados por Teichmann em 1853 e por Takayama em 1912, os quais reconheciam os cristais de hemina e de hemocromogênio, respectivamente [17].

Atualmente, o teste de certeza mais utilizado pelos peritos oficiais criminais para a identificação de hemoglobina humana em amostras forenses é o imunocromatográfico [6]. Primordialmente, é um exame para a indicação qualitativa de sangue oculto em amostras de fezes, com o intuito de auxiliar no diagnóstico de câncer colorretal, tornando-o extremamente importante para os laboratórios clínicos [10]. Em virtude de ser de fácil execução, rápida interpretação e eficaz, os ensaios imunocromatográficos passaram a possuir uma ampla aplicação na perícia criminal [19].

Assim como nos exames de sangue oculto em análises clínicas, quando a amostra é colocada na zona de aplicação e aparece uma faixa na linha T, significa que o resultado é positivo, ou seja, confirma que a amostra questionada contém sangue humano, sempre devendo ser visualizado uma faixa na linha C, pois é a linha de controle da validação teste [19]. Os testes imunocromatográficos possuem alta especificidade e a sensibilidade deles pode alcançar 1:1.000.000 [20].

Conforme estudos e pesquisas, comprovou-se que a imunocromatografia pode ser empregada para detectar a hemoglobina humana em amostras obtidas a partir de vestes, armas de fogo, armas brancas, pedaços de madeira e outros objetos de interesse criminal e superfícies que fazem parte do local de crime [1, 19]. A confirmação da presença de hemoglobina humana, auxilia o perito criminal a esclarecer uma investigação e permite a identificação da vítima quando desconhecida e do possível suspeito através das técnicas de biologia molecular [2]. Lembrando que, as amostras sanguíneas recolhidas devem ser cautelosamente identificadas e separadas corretamente para que não ocorra contaminação. O armazenamento adequado impede que a amostra se degrade rapidamente, devendo ser encaminhado ao laboratório de maneira imediata. Além disso, os testes imunocromatográficos utilizados pelos

laboratórios forenses, precisam ser propriamente validados [21].

3.3. Validação dos testes imunocromatográficos para aplicação na perícia criminal

A aplicação do teste imunocromatográfico na perícia criminal, só foi possível após a adaptação por pesquisadores, pois, comprovaram, que este pode ser utilizado para identificar a presença de sangue humano em amostras de interesse criminal, mesmo que estejam envelhecidas, contaminadas ou em estado de putrefação [2].

Dentre os diversos testes rápidos existentes para a identificação da hemoglobina humana, a primeira validação que se tem registro na literatura foi executada por Hochmeister *et al*, em 1999, no qual utilizaram o teste Hexagon OBTI® para a validação forense. Durante o procedimento, foram usadas amostras de sangue total de 10 indivíduos e várias amostras de primatas. Também foram testadas, outras secreções humanas e manchas de sangue presentes em vestes de casos periciais de diferentes idades de conservação [5].

Assim, Hochmeister *et al* demonstraram que o teste Hexagon OBTI® é uma ferramenta eficiente como teste confirmatório para identificação de hemoglobina humana, além de ser de fácil execução e interpretação, rápido e robusto, podendo ser implementado pelos laboratórios forenses. Apesar de ter se mostrado específico para a hemoglobina de primatas, outros fluidos corpóreos além do sangue, podem conter vestígios de hemoglobina, resultando na positividade do teste, porém, isso não é um impedimento nas análises [5].

A partir de então, foram realizadas novas pesquisas comparando alguns kits de ensaios imunocromatográficos, com o intuito de observar qual possui melhor sensibilidade e especificidade para a detecção de sangue em amostras forenses. Dessa forma, Andrade *et al*, em 2014, desempenharam um estudo comparativo entre o kit Hexagon OBTI® e o kit FBO One-Step Bioeasy® em amostras com sangue diluído e concluíram que ambos os testes são fáceis de serem executados, porém, o kit Hexagon OBTI® é mais sensível que o kit FBO One-Step Bioeasy®. Ressaltando ainda, que a sensibilidade do teste diminui quando as amostras são envelhecidas, sendo ideal o armazenamento em baixas temperaturas [3].

Em outro estudo, Longo e colaboradores, em 2011, analisaram se há concordância entre os resultados alcançados pelos exames presuntivos e específicos para sangue humano, com o ensaio imunocromatográfico em amostras forenses. Diante disso, avaliaram os testes Kastle-Mayer (teste presuntivo), Coombs (sorológico ou Teste da Antiglobulina Humana) e o Feca Cult One Step Test® (imunocromatográfico) [19].

De acordo com Longo e colaboradores, o ensaio imunocromatográfico Feca Cult® é vinte vezes mais sensível para a identificação de hemoglobina humana que o Coombs. Ademais, ambos os testes apresentam concordância nos resultados a equivalente 95,4%, sendo 4,6% de resultados divergentes. Tais divergências foram percebidas em amostras que possuíam vestígios sanguíneos em baixas concentrações, no qual são facilmente detectados pelo teste imunocromatográfico, devido a sua maior sensibilidade [19].

Apesar de inicialmente os ensaios imunocromatográficos serem criados com finalidades clínicas, já estão sendo desenvolvidos imunoenaios específicos para amostras de interesse pericial. Um desses kits é o SERATEC HemDirect®, que diferente dos testes convencionais, possui dois anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana como princípio ativo, o que aumenta a confiabilidade do teste. Além do mais, o teste consegue detectar no mínimo 20 ng/mL de hemoglobina humana nas amostras forenses e não apresenta reação cruzada com outras proteínas presentes no sangue [22, 23].

Portanto, mesmo que o SERATEC HemDirect® e os kits semelhantes a ele sejam os mais indicados para as análises periciais, no Brasil os testes imunocromatográficos para a constatação de sangue oculto nas fezes são os mais disponibilizados para os laboratórios forenses. Salienta-se que são exames precisos, sensíveis e específicos, necessitando uma interpretação minuciosa dos peritos criminais. Todavia, é fundamental que o material a ser periciado seja armazenado de maneira adequada e que os peritos se atentem a possíveis interferentes [2].

3.4. Interferentes na detecção de sangue humano nas análises forenses

Visto que, os testes imunocromatográficos para pesquisa de sangue oculto em fezes não foram propriamente fabricados para as amostras forenses, havendo o uso dos testes presuntivos, principalmente o luminol, não se pode descartar a interferência causada nos resultados. Neste sentido, isto têm sido bastante estudado e existem diversos apontamentos na literatura, por exemplo, Barbaro e colaboradores certificaram que o luminol altera o pH da amostra e que isso pode interferir no teste imunocromatográfico OC-Hemocard® (Alfa Wassermann), ressaltam então, que é fundamental ajustar o pH para valores em torno de 7, a fim de obter um bom funcionamento do teste [24].

Hochmeister *et al* relataram que resultados falso-negativos podem acontecer quando a amostra é exposta a alguns detergentes e alvejantes, ou entra em contato com reagentes oxidativos, assim como o luminol. Além disso, o hidróxido de sódio, componente presente na preparação

do luminol, interfere no teste imunocromatográfico para pesquisa de hemoglobina humana após 72 horas em contato com o reagente [5]. Por conseguinte, Vaz e Kobachuck também constataram que a interferência causada pelo luminol no teste imunocromatográfico WAMA® parece ter maior influência em casos de amostras mais diluídas e que permaneceram mais tempo expostas ao reagente. Apesar disso, teve sua sensibilidade comprovada para utilização em análises forenses, pois, apresentou capacidade de identificação de sangue em outros materiais, como o algodão, e não interferiu no teste quando realizado imediatamente após a pulverização do luminol e em amostras concentradas [7].

Destarte, existem divergências na literatura em relação ao luminol causar degradação do DNA, o que, posteriormente, interferirá na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), impedindo a identificação do perfil genético. Nilsson relata que há risco de degradação quando a exposição da amostra ao reagente é prolongada e De Almeida *et al* confirmam que, 30 dias após aplicação do luminol há degradação do DNA [25, 26]. Ainda que, Manna e Montpetit e Passi *et al*, descrevem que não há degradação do DNA, logo, não interfere na PCR. Não se pode descartar essa possibilidade, principalmente, após um grande período de exposição [27, 28].

Ademais, existe o chamado “efeito *hook*” que também pode resultar um falso-negativo, o qual, se dá quando a amostra está em altas concentrações, desse modo, não há formação de uma linha visível em T, pois a hemoglobina excedente faz uma ligação com os anticorpos estacionários do dispositivo e por conta disso, impede que fique evidente a hemoglobina marcada com o corante [20].

Em relação a comparação realizada por Longo *et al*, entre o reagente Kastle-Mayer com o Feca Cult®, apenas uma amostra obteve resultado negativo quando submetida ao método Kastle-Mayer. Esta ocorrência pode ser explicada em virtude de a faca utilizada no experimento estar em estado avançado de oxidação, porém, resultou positivo no teste imunocromatográfico [19]. Deste modo, é necessário aumentar a atenção em objetos periciais que exibem oxidação ou enferrujamento, visto que, foi sugerido que podem gerar resultados falso-negativos por conta da carência de aderência do sangue no material neste tipo de condição [1, 6].

Segundo os fabricantes, o kit do Feca Cult® da INLAB Diagnóstica possui salina tamponada que contém azida de sódio (NaN₃) e pode reagir com encanamentos de chumbo ou cobre no momento do descarte [14]. Em virtude disso, Yoshitake *et al* pesquisaram se esta reação química pode gerar uma interferência no resultado, para isso, utilizaram moedas, por possuírem ligas metálicas e outros materiais em sua composição, incluindo o cobre, e advertiram que o teste realmente pode emitir resultados falso-positivos em amostras que estiveram em contato com o cobre. Além

disso, também identificaram uma resolução para essa interferência, evitando que laudos periciais sejam emitidos erroneamente, constataram então, que o reagente Adler-Ascarelli (benzidina) pode ser empregado como um controle negativo, pois ele reage com o sangue mas não reage com sais de cobre. Portanto, amostras que porventura estiveram em contato com superfícies ou objetos que contém cobre, devem ser testadas pela benzidina para obter um resultado confiável. Isto posto, um resultado positivo para sangue humano e não reagente para benzidina, indica ausência de sangue, denotando a interferência do cobre [6].

Existe ainda, uma pequena probabilidade de um falso-positivo caso a sequência de aminoácidos-alvo for comum entre a hemoglobina humana e de outras espécies. Já foram relatados falso-positivos com sangue de *Pongo pygmaeus* (orangotango) e na literatura consta que com sangue de *Mustela putorius furo* (furões) também [29].

3.5. Diferenças e similaridades na aplicação dos testes imunocromatográficos nas análises clínicas e forenses

Por se tratar de um teste laboratorial adaptado para o uso na perícia, algumas diferenças e similaridades podem ser observadas e devem ser comparadas, a fim de preservar a qualidade da sensibilidade e da especificidade. Sendo assim, a principal diferença está no tipo de amostra que será avaliada. Os materiais periciais a serem analisados são muito diversificados, além de serem oriundos de uma cena de crime. Dentre eles, podemos citar: facas, canivetes, enxadas, madeira, dinheiro, roupas, pedaços de tecido, terra, areia, metal, asfalto e qualquer outro objeto que sirva como prova de crime disponível no local. Enquanto no laboratório clínico, por sua vez, a única amostra a ser analisada são as fezes [1].

No que se refere a coleta do material a ser estudado, a técnica a ser aplicada também difere. No laboratório de análises clínicas, as fezes são coletadas de forma bem simples, separando uma pequena porção com a espátula disponível pelo próprio kit, que é inserida no tubo coletor e em seguida homogeneizada. Após obter a amostra diluída, ela é aplicada no dispositivo para posterior leitura. Em contrapartida, na análise forense três procedimentos diferentes podem ser utilizados, variando de acordo com o tipo de amostra encontrada. Segundo Longo e colaboradores, em amostras com maior volume de concentração sanguínea, a técnica consiste em esfregar a haste do aplicador no local, em seguida, introduzir no tubo coletor e homogeneizar vigorosamente. Para amostras em vestes, o ideal é alíquotar uma pequena parcela e introduzir diretamente no tubo coletor para que a amostra seja obtida com a solução ou o pedaço deve ser depositado em um tubo de ensaio, adicionar a solução do tubo coletor e homogeneizar vigorosamente. Com a amostra diluída corretamente, 3 gotas da solução final são

aplicadas no dispositivo e o resultado é lido em 5 minutos [19].

Quando comparado o teste imunocromatográfico em laboratórios clínicos e forenses, observa-se que a metodologia empregada é bastante similar, por se tratar de um teste que identifica a presença de hemoglobina humana tanto em fezes quanto em amostras diversas, de forma qualitativa, através da leitura da tira reagente no dispositivo. Essas técnicas facilitam a rotina de ambos os laboratórios, por serem de fácil execução, praticidade e resultados quase que imediatos [1].

Os principais diluentes utilizados na pesquisa de hemoglobina humana são a água destilada, solução fisiológica e solução salina tamponada disponível nos kits. É importante salientar que a prova do crime normalmente encontra-se em situações que não mantêm sua integridade, sendo elas expostas ao tempo, a oxidação, a putrefação, ou sendo ainda adulteradas criminalmente com detergentes e produtos químicos alvejantes, a fim de mascarar os indícios. A técnica de coleta a ser utilizada e a conservação dos materiais influencia diretamente em falso-negativos ou falso-positivos os resultados esperados. Portanto, a preservação da amostra deve ser assegurada corretamente [1].

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os estudos apresentados durante o processo de validação, o teste imunocromatográfico utilizado nas análises clínicas para pesquisa de sangue oculto em fezes, pode, de fato, ser aplicado na biologia forense. Ainda que apresente alguns interferentes, são testes de fácil execução, rápida interpretação, sensíveis e específicos, por conta disso, mesmo sendo testes mais caros, possuem maior custo-benefício, visto que se mostraram mais vantajosos em comparação aos testes presuntivos, pois identificam, especificamente, sangue humano. Entretanto, os peritos devem ficar atentos para tomar as devidas providências se, porventura, presenciarem situações que podem causar interferência no teste. Além disso, os testes já são amplamente utilizados pelos laboratórios forenses, apesar de já existirem testes imunocromatográficos propriamente fabricados para as análises periciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.P.S. Lima; M.M.I. Pereira. Análise de Sangue Humano Coletado de Diferentes Superfícies e Substratos Através da Técnica Imunocromatográfica Feca Cult One Step Test. *Braz. J Forensic Sci., Med. Law and Bioethics* **7(1)**: 69-79 (2017).
- [2] A.E. Santos. As Principais Linhas da Biologia Forense e como Auxiliam na Resolução de Crimes. *Rev. Bras. Crimin.* **7(3)**: 12-20 (2018).
- [3] A.F.B. Andrade et al. Forensic Identification of Human Blood: comparison of two one-step presumptive tests for blood screening of crime scene samples. *Rev. Bras. Crimin.* **3(1)**: 12-15 (2014).
- [4] M.G. Cordeiro. Métodos Comparativos de Sangue Oculto no Rastreamento do Câncer Colorretal: Revisão de Literatura. *Dissertação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Especialização em Análises Clínicas, Universidade Federal do Paraná* (2018).
- [5] M.N. Hochmeister et al. Validation Studies of an Immunochromatographic 1-Step Test for the Forensic Identification of Human Blood. *J Forensic Sci.* **44(3)**: 597-602 (1999).
- [6] N.M. Yoshitake et al. Resultado Falso-Positivo para Sangue Humano pela Ação do Interferência Química do Cobre em Teste Imunocromatográfico. *Rev. Bras. Crimin.* **4(2)**: 27-32 (2015).
- [7] V.S. Vaz; L.D.G. Kobachuck. A Interferência da Solução Luminol em Teste Imunocromatográfico para Pesquisa de Sangue Humano. *Rev. Bras. Crimin.* **6(3)**: 17-22 (2017).
- [8] A. Harb-Gama. Câncer Colorretal: a importância de sua prevenção. *Arq. Gastroenterol.* **42(1)**: 2-3 (2005).
- [9] B.R.V. Freitas. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes pelo Teste Imunoquímico: comparação com os achados da colonoscopia na detecção de adenomas avançados e do câncer colorretal. *Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas* (2013).
- [10] F.L. Altenburg et al. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes e Correlação com Alteração nas Colonoscopias. *Rev. Bras. Coloproct.* **27(3)**: 304-309 (2007).
- [11] L.V. Borges. Comparação entre Testes Químicos (o-toluidina) e Imunoquímico de Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes e Correlação com os Achados Colonoscópicos. *Dissertação de Mestrado, Programa de Ciências em Gastroenterologia, Universidade de São Paulo* (2013).
- [12] M.V.A.S. Maia et al. Preferência do Paciente no Rastreamento do Câncer Colorretal: uma comparação entre colonografia por tomografia computadorizada e colonoscopia. *Radiol Bras.* **45(1)**: 24-28 (2012).
- [13] A.P.T.P. Dias; A.M. Gollner; M.T.B. Teixeira. Câncer Colorretal: rastreamento, prevenção e controle. *HU Rev.* **33(4)**: 125-131 (2007).
- [14] Bula INLAB Confiança. FECA-CULT ONE STEP TESTE, 2008.
- [15] Bula WAMA Diagnóstica. IMUNO-RÁPIDO SANGUE OCULTO, 2010.
- [16] V.W. Botteon Interpretação do Padrão de Manchas de Sangue em Caso de Homicídio em Local Inidôneo. *Braz. J Forensic Sci., Med. Law and Bioethics* **7(3)**: 162-171 (2018).
- [17] M.C.T. Sawaya; M.R.S. Rolim. *Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório*. Editora Juruá, Brasil (2009) 19-25.

- [18] J.P. Almeida. Influência dos Testes de Triagem para Detecção de Sangue nos Exames Imunológicos e de Genética Forense. *Dissertação de Mestrado*, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2009).
- [19] P. Longo et al. Avaliação Comparativa do Teste Imunocromatográfico para Identificação Forense de Sangue Humano. *Rev. Bras. Crimin.* **1(1)**: 16-21 (2011).
- [20] C.R.D. Filho; P.A.C. Francez *Introdução à Biologia Forense*. Millennium Editora, Brasil (2016) 9-15.
- [21] T.M.B. Nogueira. Análise de Padrões de Manchas de Sangue: a importância médico-legal. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (2013).
- [22] C. Stadler; C.R. Dias Filho; M.G. Roca. Cross Reaction and Forensic Comparison of Blood Testing done by Private and Public Sector Laboratories. *Rev. Bras. Crimin.* **6(2)**: 31-37 (2017).
- [23] Bula SERATEC. HemDirect, 2019.
- [24] A. Barbaro et al. Validation of Forensic DNA Analysis from Bloodstains Treated by Presumptive Test Reagents. *International Congress Series* **1261**: 631-633 (2004).
- [25] A. Nilsson. The Forensic Luminol Test for Blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis. *The Swedish National Lab. Forensic Sci*: 1-11 (2006).
- [26] J. P. de Almeida et al. Effect of Presumptive Tests Reagents on Human Blood Confirmatory Tests and DNA Analysis Using Real Time Polymerase Chain Reaction. *Forensic Sci. International* **206(1-3)**: 58-61 (2011).
- [27] A. Manna; S. Montpetit. A Novel Approach to Obtaining Reliable PCR Results from Luminol Treated Bloodstains. *J Forensic Sci.* **45(4)**: 886-890 (1999).
- [28] N. Passi et al. Effect of Luminol and Bleaching Agent on the Serological and DNA Analysis from Bloodstains. *Egyptian J Forensic Sci.* **2(2)**: 54-61 (2012).
- [29] D. Hermon et al. The Use Hexagon OBTI Test for Detection of Human Blood at Crime Scenes and on Items of Evidence. *J Forensic Identif.* **53(5)**: 566-575 (2003).