



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INFLUÊNCIA DOS TESTES DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE SANGUE NOS
EXAMES IMUNOLÓGICOS E DE GENÉTICA FORENSE

Juliana Piva de Almeida

Orientadora: Dra. Cristina Bonorino

Porto Alegre

2009

JULIANA PIVA DE ALMEIDA

**INFLUÊNCIA DOS TESTES DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE SANGUE NOS
EXAMES IMUNOLÓGICOS E DE GENÉTICA FORENSE**

Dissertação apresentada como
requisito para obtenção ao grau de
Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Dra. Cristina Bonorino

Porto Alegre

2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Juelci e Juçara, que são meus exemplos de caráter e perseverança.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Cristina Bonorino, por ter confiado em mim, guiando-me nesse desafio.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

À Secretaria Nacional de Segurança Pública e ao Instituto Geral de Perícias, por terem financiado este trabalho.

Aos amigos do Setor de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias, por alegrarem os meus dias e, de maneira especial, à Auxiliar de Perícias Amanda da Silva.

À Perita Químico-Forense Bianca de Almeida Carvalho, por ter me apresentado ao mundo da Genética Forense.

À estagiária Nadine Glesse, com quem pude contar sempre.

À Seção de Biologia Molecular da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), por ter disponibilizado o equipamento para quantificação de DNA; especialmente à Farmacêutica Bioquímica Cíntia Costi, pela ajuda.

Aos meus pais, Juelci e Juçara, e aos meus irmãos, Jonathan e Jordan, pelo amor incondicional.

Às demais pessoas que contribuíram, mesmo que indiretamente, para que este trabalho pudesse ser realizado.

“... O sangue ou sêmen que o criminoso deposita... – todos estes e ainda mais, sustentam o testemunho mudo contra ele. Isto é evidência que não esquece... A evidência física não pode estar errada: ela não pode danificar-se; ela não pode estar completamente ausente... Apenas a falha humana em achá-la, estudá-la e entendê-la pode diminuir seu valor.”

Paul Kirk, *Crime Investigation*, 1953.

RESUMO

Manchas de sangue são vestígios de grande importância para a elucidação de um crime. Sangue diluído, invisível a olho nu, ou em superfícies escuras, pode ser detectado utilizando reagentes especiais, através dos chamados “testes presuntivos”. Os efeitos dos testes preliminares para sangue utilizando luminol, Luminol 16[®], Bluestar[®] Forensic e benzidina sobre os métodos de inibição da antiglobulina humana, imunocromatográfico para hemoglobina humana e sobre o exame de DNA foram avaliados nesse trabalho. As manchas de sangue foram produzidas através da aplicação de 2 µL de sangue venoso em fragmentos de tecido branco (100% algodão). As amostras foram submetidas aos exames presuntivos e deixadas para secar por 48 horas antes da realização dos testes de inibição da antiglobulina humana e imunocromatográfico para hemoglobina humana. O DNA foi extraído pelo método orgânico e quantificado com Quantifiler[®] Human DNA Quantification (Applied Biosystems) em 48 horas, 7 dias, 30 dias ou 120 dias após a aplicação dos reagentes. As amostras tratadas com ambas as preparações de luminol ou com Bluestar[®] Forensic obtiveram resultado positivo nos exames imunológicos, mostrando que não influenciam nos testes confirmatórios para sangue humano. As 20 amostras tratadas com benzidina tiveram resultado negativo no teste de inibição da antiglobulina humana. Das 20 amostras submetidas ao teste imunocromatográfico, 18 obtiveram resultado negativo, evidenciando o efeito deletério da benzidina sobre os testes confirmatórios para sangue humano. Através de PCR em tempo real foi possível observar que, 48 horas após contato com a solução de benzidina, as amostras tiveram o DNA degradado. Todos os reagentes testados causaram degradação do DNA, em diferentes extensões, após 120 dias de sua aplicação.

Palavras-chave: forense, testes presuntivos, sangue, luminol, Luminol 16[®], Bluestar Forensic[®], benzidina, DNA.

ABSTRACT

Bloodstains are one of the major physical evidence to elucidate a crime. Diluted blood invisible to the naked eye can be detected using special reagents called presumptive tests. The effects of presumptive tests with luminol, Luminol 16[®], Bluestar[®] Forensic and benzidine on the inhibition of human antiglobulin test, human hemoglobin immunochromatographic test and genotyping were evaluated in this study. All bloodstains were prepared by application of 2 μ L drop of venous blood to squares of white cloth (100% cotton) and allowed to dry for 48 hours. Samples were then submitted to presumptive tests and dried for 48 hours before the inhibition of human antiglobulin and human hemoglobin immunochromatographic tests were evaluated. DNA was extracted by the organic method and quantified by Quantifiler[®] Human DNA Quantification (Applied Biosystems) at 48 hours, 7 days, 30 days or 120 days after reagents application. Samples treated with both luminol solutions or Bluestar[®] Forensic gave positive results at immunologic tests, indicating non-interference with human blood confirmatory tests. Twenty samples treated with benzidine were negative for the inhibition of human antiglobulin test. Of the 20 bloodstains submitted to immunochromatographic test, 18 resulted negative, evidencing a deleterious effect of benzidine over human blood confirmatory tests. Real time PCR showed that 48 hours after benzidine solution application, DNA of samples was degraded. After 120 days of treatment, all treated samples had degraded DNA compared to the untreated material, to different extents.

Keywords: forensic sciences, presumptive tests, luminol, Luminol 16[®], Bluestar[®], benzidine, bloodstains, DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura cristalográfica da desoxihemoglobina humana.....	12
Figura 2- Estrutura do grupo heme.....	13
Figura 3- Estrutura da hematina.....	13
Figura 4- Estrutura da hemina.....	14
Figura 5- Oxidação da benzidina por peróxido de hidrogênio.....	18
Figura 6- Esquema da rotina dos testes realizados para detecção de sangue no Setor de Imunohematologia do Laboratório de Perícias do Instituto Geral de Perícias/RS	22

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

STR - Short Tandem Repeat

EPI - Equipamento de Proteção Individual

hTERT - Transcriptase Reversa da Telomerase Humana

IPC – Controle Interno da PCR

CT – Threshold Cycle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	SANGUE.....	11
1.2	TESTES PRESUNTIVOS PARA DETECÇÃO DE SANGUE	14
1.2.1	Luminol.....	15
1.2.2	Bluestar® Forensic.....	17
1.2.3	Benzidina (Teste de Adler-Ascarelli)	17
1.2	TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA SANGUE HUMANO	19
1.2.1	Teste de Inibição da Antiglobulina Humana	19
1.2.2	Teste imunocromatográfico para detecção de hemoglobina humana	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	ARTIGO CIENTÍFICO	24
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O sangue detectado em locais de crime, nas roupas usadas pela vítima ou pelo suspeito, em veículos, ou em objetos apreendidos, é uma das evidências físicas mais importantes em investigações criminais, sendo, muitas vezes, decisiva para a resolução do inquérito policial. Se adequadamente coletado e preservado, o sangue encontrado pode estabelecer uma forte relação entre o assassino, a vítima e a cena do crime. Na tentativa de ocultar vestígios, os criminosos podem lavar as manchas, tornando-as invisíveis a olho nu. Contudo, o sangue latente pode ser detectado através de alguns reveladores químicos, como a benzidina e o luminol. Com o aperfeiçoamento das técnicas forenses, gradativamente mais centradas na análise molecular, deve-se ter a preocupação de que os reveladores usados para detecção de sangue não alterem a estrutura das moléculas biológicas, especialmente o DNA (ácido desoxirribonucleico). Essas possíveis alterações comprometem a evidência física e, conseqüentemente, têm impacto negativo na investigação forense, especialmente a longo prazo, pois muitas amostras são armazenadas para testes de confirmação e genotipagem que serão executados semanas ou meses após sua coleta na cena do crime. Dessa forma, uma análise detalhada do impacto dos agentes reveladores sobre a integridade molecular do sangue em manchas é fundamental para a boa prática forense.

1.1 SANGUE

O sangue é um tecido composto por plasma e componentes celulares (leucócitos, eritrócitos e plaquetas). Sua principal função é transportar oxigênio para os tecidos e remover o dióxido de carbono. O sangue de um ser humano precisa transportar, diariamente, cerca de 600 litros de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Quase todo o oxigênio está ligado à hemoglobina e é transportado assim pelos eritrócitos. Os eritrócitos são formados na medula óssea e lançados na

circulação, atingindo a concentração média de 5×10^{12} células/L, sendo responsáveis por cerca de 45% do volume sanguíneo (1). No processo de maturação, as células precursoras dos eritrócitos perdem as organelas celulares como núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático, e aumentam a produção de hemoglobina. As hemácias são, assim, células incompletas, incapazes de proliferar e viáveis por cerca de 120 dias em humanos (2).

A hemoglobina adulta contém quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com um grupo prostético heme, responsável pela coloração vermelha dos eritrócitos (Figura 1). A porção protéica, chamada globina, consiste de duas cadeias α , cada uma com 141 resíduos de aminoácidos, e duas cadeias β , cada uma com 146 resíduos (2).

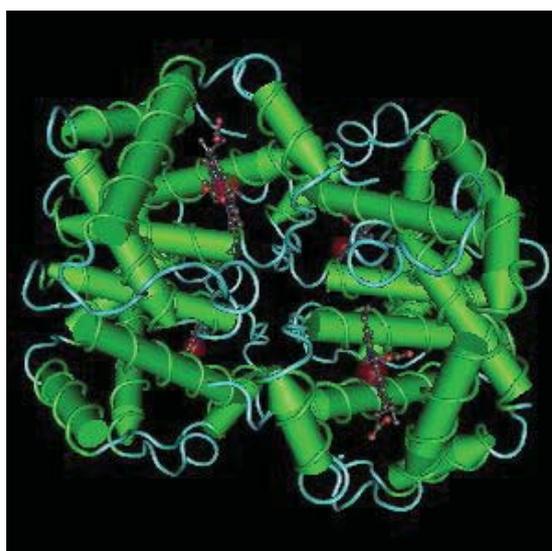


Figura 1. Estrutura cristalográfica da desoxihemoglobina humana [PDB ID 2DN2(3)]

O grupo heme é sintetizado a partir da glicina. A primeira e as três últimas etapas de sua síntese ocorrem na mitocôndria e as demais, no citosol. É formado por um complexo anel porfirínico IX e um átomo ferroso (Fe^{+2}) conjugado (4). Está unido a cada uma das cadeias polipeptídicas da hemoglobina através de uma ligação ao grupo R de um resíduo de histidina. A sexta ligação de coordenação do átomo de ferro em cada grupo heme é empregada para ligar o O_2 (Figura 2). Está acomodado em uma bolsa delimitada por cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Isso é importante para a sua função, uma vez que grupos heme em

uma solução oxigenada são rapidamente oxidados da forma ferrosa (Fe^{+2}), que liga-se reversivelmente ao O_2 , para a forma férrica (Fe^{+3}), que não se liga ao O_2 (2). A liberação do heme da globina leva à oxidação do ferro e à geração da hematina (Figura 3). Na presença de íons cloreto (Cl^-), o heme é convertido em hemina (Figura 4), a forma oxidada do ferro protoporfirínico IX (4). O grupo heme, sobretudo no estado férrico, pode exercer uma “falsa” atividade enzimática, participando de reações redox, como a oxidação de moléculas lipídicas (5).

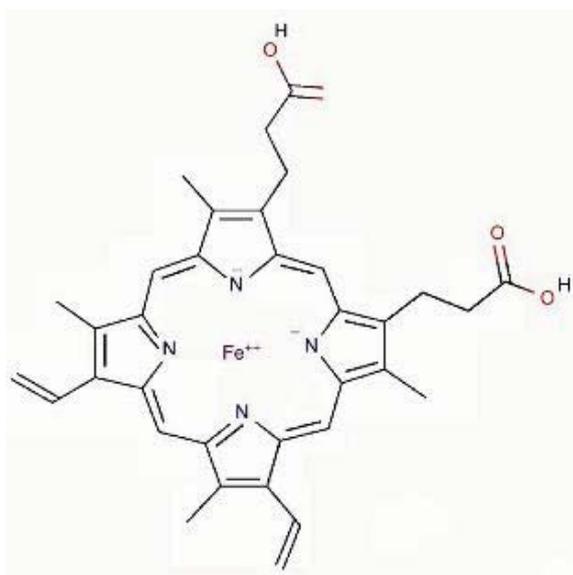


Figura 2. Estrutura do grupo heme (4)

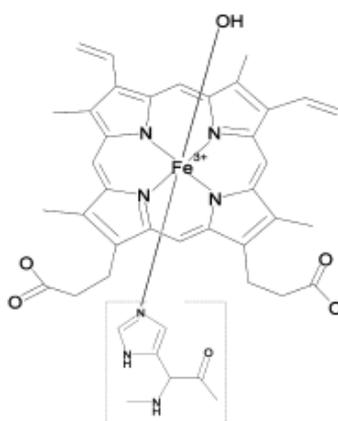


Figura 3. Estrutura da hematina (6)

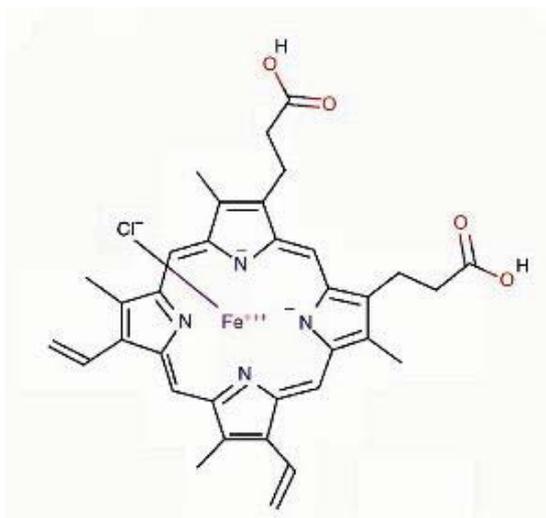
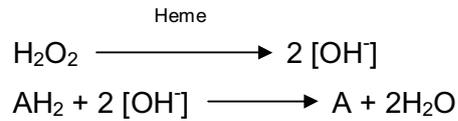


Figura 4. Estrutura da hemina (4)

Fora do organismo, o sangue está sujeito a uma série de processos de degradação. Com o passar do tempo e a conseqüente oxidação da hemoglobina, o átomo de ferro muda de heme para hemina ou hematina. Essa conversão ocasiona a alteração da cor da mancha de sangue de vermelha para marrom. No estado férrico, o grupo heme possui atividades catalíticas e capacidade de participar em reações redox como um grupo de enzimas chamadas peroxidases. Essa atividade é empregada como base dos testes presuntivos para identificação de sangue (7).

1.2 TESTES PRESUNTIVOS PARA DETECÇÃO DE SANGUE

Os testes presuntivos para detecção de sangue, também chamados testes de orientação, têm como princípio uma reação de oxidação de uma substância (indicador) por um agente oxidante, catalisada na presença de sangue. Baseiam-se na ação tipo-peroxidase do grupo heme da hemoglobina, que atua sobre o peróxido de hidrogênio adicionado, liberando o oxigênio necessário para oxidar o indicador utilizado, formando um composto corado ou emitindo luminescência (8). Os indicadores mais utilizados na rotina forense são: luminol (3-aminofalhidrazida), benzidina (reagente de Adler-Ascarelli), fenolftaleína (reagente de Kastle-Meyer), ortotoluidina e verde malaquita (9).



Onde:

AH₂ é o indicador

A é o produto oxidado (colorido ou quimioluminescente)

Esses testes devem apresentar alto valor preditivo negativo, com sensibilidade suficiente para detectar manchas de sangue em concentrações não visíveis a olho nu e, além disso, não podem comprometer a realização de exames posteriores.

A sensibilidade dos testes presuntivos para sangue, bem como do exame de DNA, é influenciada pela composição das fibras dos tecidos. Tecidos com fibras de algodão conduzem a melhores resultados, por possuírem maior poder de retenção que os tecidos compostos por fibras sintéticas (10, 11).

Os testes que utilizam indicadores quimioluminescentes, como o luminol, apresentam a grande vantagem de detectarem, em curto período de tempo, traços de sangue em grandes superfícies e em suportes escuros, mesmo após terem sido lavados.

1.2.1 Luminol

O luminol (3-aminofalhidrazida) é um reagente muito utilizado pelos laboratórios forenses. É um teste com alta sensibilidade (1:100.000, em superfícies não absorventes (12, 13) e 1:5.000.000 em tecido de algodão (14). Apresenta baixa especificidade, gerando resultados falso-positivos com peroxidases de plantas, íons metálicos como cobalto, cobre e ferro, hipoclorito, algumas tintas esmaltadas e outros oxidantes (15-18). A luminescência gerada pelo hipoclorito presente em alvejantes domésticos é emitida em comprimento de onda diferente da luminescência emitida na presença de hemoglobina (19) e apresenta características e tempo de duração desiguais da luminescência gerada por manchas de sangue.

Aguardando-se, no mínimo, 8 horas para aplicação do luminol (18, 20, 21), ou adicionando-se 0,05 mol/L de glicina à preparação (20), a interferência do hipoclorito pode ser evitada.

A oxidação do luminol leva à formação de um íon aminoftalato em um estado excitado, que emite luz quando o elétron retorna ao estado fundamental (22). A reação é muito rápida (alguns segundos) e requer escuridão total para a observação da luminescência.

Em 1985, Thornton e Maloney propuseram um mecanismo de reação do luminol, no qual a hemina atua como catalisador, promovendo a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio em solução alcalina. A valência normal do ferro na hemoglobina é no estado ferroso (Fe^{+2}). Com o envelhecimento da mancha de sangue, a hemoglobina é convertida em metahemoglobina e o ferro é oxidado ao estado férrico (Fe^{+3}). Com a adição de peróxido de hidrogênio, o ferro é oxidado ao estado de transição (Fe^{+4}). Durante a oxidação do luminol, o Fe^{+4} é reduzido a Fe^{+3} , assim permitindo a participação do ferro do grupo heme a participar em outra reação. Esse mecanismo explica o fato de que manchas de sangue lavadas e submetidas ao luminol diversas vezes gerem luminescência mais intensa que manchas frescas (7).

O luminol é um composto lábil, necessitando de refrigeração, e o preparo da solução deve ser feito no momento do uso, o que, muitas vezes, dificulta o seu uso em local de crime.

Seus efeitos sobre testes subseqüentes têm sido bastante discutidos. O luminol prejudica a realização de testes de cor que utilizam como indicadores fenolftaleína e tetrametilbenzidina (23). Além disso, certas preparações de luminol podem comprometer os resultados obtidos nos testes imunológicos confirmatórios para sangue. Soluções de luminol contendo hidróxido de sódio afetaram a realização do teste imunocromatográfico para hemoglobina humana após 72 horas de contato com o reagente (24) e de métodos sorológicos tradicionais para tipagem sanguínea (23, 25, 26). Através da análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), com dados semiquantitativos, foi demonstrado que o luminol não tem efeito deletério sobre o exame de DNA extraído de manchas de sangue em vidro e tecidos de algodão (9). Com o desenvolvimento de novas técnicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a obtenção de perfis genéticos em quantidades mínimas de material biológico, também foram obtidos resultados

satisfatórios na genotipagem, mesmo após a aplicação do luminol (12, 23, 27-31). A extração do DNA, nesses estudos, foi feita logo após a aplicação do luminol e a genotipagem foi realizada utilizando *loci* de STRs (Short Tandem Repeat).

1.2.2 Bluestar® Forensic

Na tentativa de atenuar os inconvenientes apresentados pelo luminol, foi desenvolvido o Bluestar® Forensic, produzido através de alterações na fórmula do luminol. Por ser um produto recentemente lançado, há poucos estudos demonstrando suas características e efeito sobre outros testes subseqüentes utilizados para a identificação de sangue humano.

O fabricante *Roc Import* afirma que a luminescência emitida pelo Bluestar® Forensic é mais forte e duradoura que a emitida pelo luminol (32), não requer escuridão total para a visualização (33) e apresenta padrões de luminescência diferentes entre as reações positivas e as falso-positivas (32). Além disso, o Bluestar® é de fácil preparação e tem maior estabilidade, não necessitando de cuidados especiais para o armazenamento (34). Mostra-se, assim, uma promissora ferramenta para a perícia forense. A sensibilidade do Bluestar® Forensic varia de 1:10.000 (32) a 1: 100.000 (13). O Bluestar® Forensic demonstrou ser menos específico que o luminol, gerando reações falso-positivas com vários interferentes testados. Além disso, também requer escuridão total para a visualização do resultado. Sua aplicação não afetou a análise posterior de DNA utilizando *loci* de STRs (13), mesmo em amostras expostas ao fogo (35). A genotipagem, nesses estudos, foi realizada logo após a aplicação do reagente.

1.2.3 Benzidina (Teste de Adler-Ascarelli)

Dos testes presuntivos de cor, a benzidina (4,4'-diaminobifenil) é o que apresenta maior sensibilidade, característica fundamental para um teste de triagem.

A reação de oxidação da benzidina em meio ácido resulta na formação de um intermediário de coloração azul, e, após alguns minutos, de um produto final de coloração marrom (Figura 5). A estabilidade do intermediário azul é maximizada em pH 4,5, assim, a reação é conduzida na presença de ácido acético. O teste é realizado em dois estágios para reduzir a ocorrência de resultados falso-positivos. Se, após a adição de uma gota do reagente sobre a mancha a ser testada, antes da adição do peróxido de hidrogênio, ocorrer alteração na coloração, isso indica a presença de interferentes e o resultado pode ser classificado como falso-positivo.

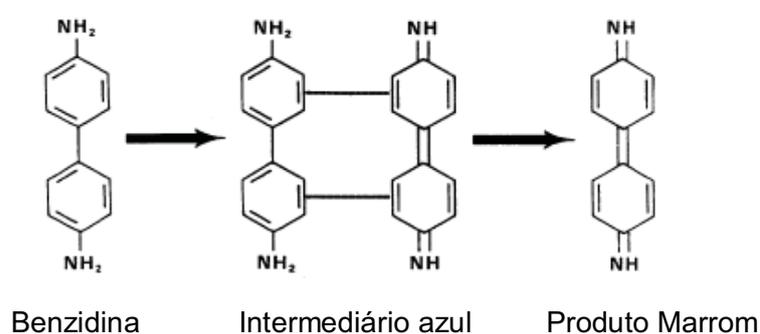


Figura 5. Oxidação da benzidina por peróxido de hidrogênio (36)

Os valores de sensibilidade do teste variam de 1:20.000 (36) a 1:1.000.000 (37).

O uso da benzidina tem sido evitado em muitos laboratórios forenses devido ao seu potencial carcinogênico (29, 32, 38). Foi relatada a ocorrência de tumores de bexiga em seres humanos e cães e, em ratos, de tumores no intestino, fígado e canal auditivo (39, 40). Entretanto, a cautela durante o uso, através da utilização de EPIs (equipamentos de proteção individual), evita seus potenciais danos à saúde.

Em estudo realizado por Pascual e Grifo, resultados falso-negativos para o teste da benzidina foram observados quando suco de limão foi adicionado a amostras de sangue. Isso pode ter ocorrido devido à presença de ácido ascórbico presente no limão, o qual é um forte agente redutor (41).

Há poucos estudos verificando os efeitos da benzidina sobre os testes posteriores. Manchas de sangue tratadas com benzidina dissolvida em ácido acético glacial não produziram quantidades de DNA detectável em gel, através da análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (9).

1.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA SANGUE HUMANO

Após a detecção da mancha, através dos testes acima descritos, é importante a caracterização da origem humana do sangue, geralmente realizada através de exames imunológicos.

1.2.1 Teste de Inibição da Antiglobulina Humana

Dos exames sorológicos utilizados para verificação da presença de sangue humano, o mais utilizado e menos oneroso é o teste de inibição da antiglobulina humana (Teste de Vacher-Sutton), o qual demonstra a presença de globulina humana na amostra. A globulina humana presente na amostra inibirá a atividade do soro antiglobulina humana (soro de Coombs), o qual perderá a capacidade de aglutinar células vermelhas sensibilizadas por anticorpos Rh. Na reação, hemácias Rh positivo revestidas com anticorpos, como IgG, são aglutinadas por anticorpo anti-IgG, o qual une moléculas de anticorpo às células vermelhas vizinhas. Sabe-se que o soro antiglobulina humana pode ser neutralizado por pequenas quantidades de soro humano e que seu efeito de neutralização é antígeno-específico. A ausência de aglutinação indica, assim, a presença da proteína humana (42-44).

1.2.2 Teste imunocromatográfico para detecção de hemoglobina humana

Esse teste utiliza anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana conjugados com partículas de corante azul. O imunocomplexo formado migra através da membrana até a zona de reação, onde será capturado por um segundo anticorpo direcionado contra hemoglobina humana. A formação do “sanduíche” anticorpo-antígeno-anticorpo concentra as partículas de corante, formando uma linha azul, que indica a presença de hemoglobina humana na amostra. Anticorpos anti-hemoglobina humana monoclonais móveis que não estiverem ligados ao

antígeno migram pela membrana até a zona controle, onde serão imobilizados por anticorpos anti-IgG presentes, formando uma linha azul correspondente ao controle. Assim, se o resultado for positivo, aparecerão duas linhas; e, se for negativo, uma linha deve se formar na região correspondente ao controle (24).

A sensibilidade desse exame varia de 1:1.000 (45, 46) a 1:1.000.000 (sangue humano em tampão Tris), dependendo do tempo de incubação e do suporte utilizado, e é específico para sangue de primatas. O contato das amostras de sangue com certos detergentes e alvejantes e a exposição prolongada a certas preparações de luminol prejudica o desempenho do teste (24).

Sua execução é muito mais rápida e prática que o teste de inibição da antiglobulina humana. Além disso, não requer a manipulação dos reagentes, evitando contaminação da amostra. Porém, seu custo é bem mais elevado do que o teste tradicional. Para a realidade dos laboratórios forenses brasileiros, cujos recursos financeiros são escassos, e para laboratórios com grande demanda, sua inserção na rotina pode tornar-se onerosa.

Confirmada a origem humana do sangue na amostra, é importante a obtenção do perfil genético, para que, através de comparação com materiais de referência (sangue, *swab* oral, dentes ou ossos, entre outros), seja possível a identificação do indivíduo doador do material.

1.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

É possível a determinação da quantidade de material genético humano presente, bem como a verificação da presença de inibidores no material extraído, através da realização de PCR em tempo real utilizando uma sonda TaqMan[®] (47, 48). O *Kit* Quantifiler[®] Human DNA Quantification (Applied Biosystems) permite a quantificação de DNA nuclear humano total, através da detecção e amplificação do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), localizado na porção distal do cromossomo 5 (5p15.33). O *Kit* possui um fragmento de DNA sintético, que é co-amplificado, atuando como controle interno da PCR (IPC), indicando qualquer problema que ocorra na reação, como a presença de inibidores nas amostras. O DNA presente nas amostras e o DNA sintético são distinguidos um do outro através

da presença dos fluoróforos FAM[®] e VIC[®], específicos, respectivamente, aos moldes hTERT e IPC, ligados à extremidade 5' da sonda TaqMan[®]. Esse sistema é baseado em um conjunto de *primers* específicos para a seqüência alvo de DNA e uma sonda TaqMan[®], ligada a um repórter fluorescente na extremidade 5' e a um silenciador (*quencher*) na extremidade 3', que é homólogo à região do *amplicon* entre os *primers*. No início da PCR toda a molécula da sonda TaqMan[®] está intacta e a proximidade física entre o fluoróforo e o silenciador suprime a fluorescência por transferência da energia tipo Förster. Durante a síntese de novas fitas de DNA a enzima AmpliTaqGold, que é uma DNA polimerase termicamente estável, encontra a sonda TaqMan[®] anelada ao DNA molde e a sua atividade 5'-3' exonuclease a hidrolisa. A hidrólise da sonda separa o fluoróforo do silenciador, o que faz com que as moléculas de fluoróforo emitam fluorescência mais intensamente. A hidrólise da sonda ocorre à medida proporcionalmente à amplificação da seqüência alvo, o que, conseqüentemente, resulta em um sinal de fluorescência. O número de ciclos em que o sinal de fluorescência atravessa o limiar é definido como "Threshold Cycle", ou C_T. Há uma relação matemática inversa entre o número de cópias iniciais de moléculas de seqüência alvo e o C_T resultante, que é a base da PCR quantitativa. O método é capaz de detectar concentrações inferiores a 23 pg/μL DNA humano (48).

O Laboratório do Instituto Geral de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul realiza pesquisa de sangue humano nos mais diversos objetos, como roupas, veículos, materiais provindos de locais de crime, facas e armas de fogo. Os materiais são analisados visualmente. Caso haja mancha aparente, um pequeno fragmento é recortado, ou coletado com *swab*, e submetido ao teste de orientação com benzidina. Os fragmentos com benzidina são descartados. Se a quantidade de material for escassa, as amostras são submetidas diretamente a exame de DNA, sem passarem pelos testes de orientação, que podem deteriorar o material genético presente. Muitas vezes, essas manchas não se tratam de sangue, tampouco, qualquer outro fluido biológico humano. Isso exige tempo e gasto desnecessário com reagentes utilizados para extração, amplificação e genotipagem, uma vez que, não se obtendo perfil genético adequado, as etapas do exame de DNA são repetidas, no mínimo, três vezes, ou até o esgotamento do material. As amostras somente são submetidas ao teste com luminol como última alternativa, caso não seja possível a visualização de manchas, devido a incerteza dos efeitos da

formulação utilizada sobre os testes posteriores. O fluxograma abaixo ilustra a seqüência de testes realizada:

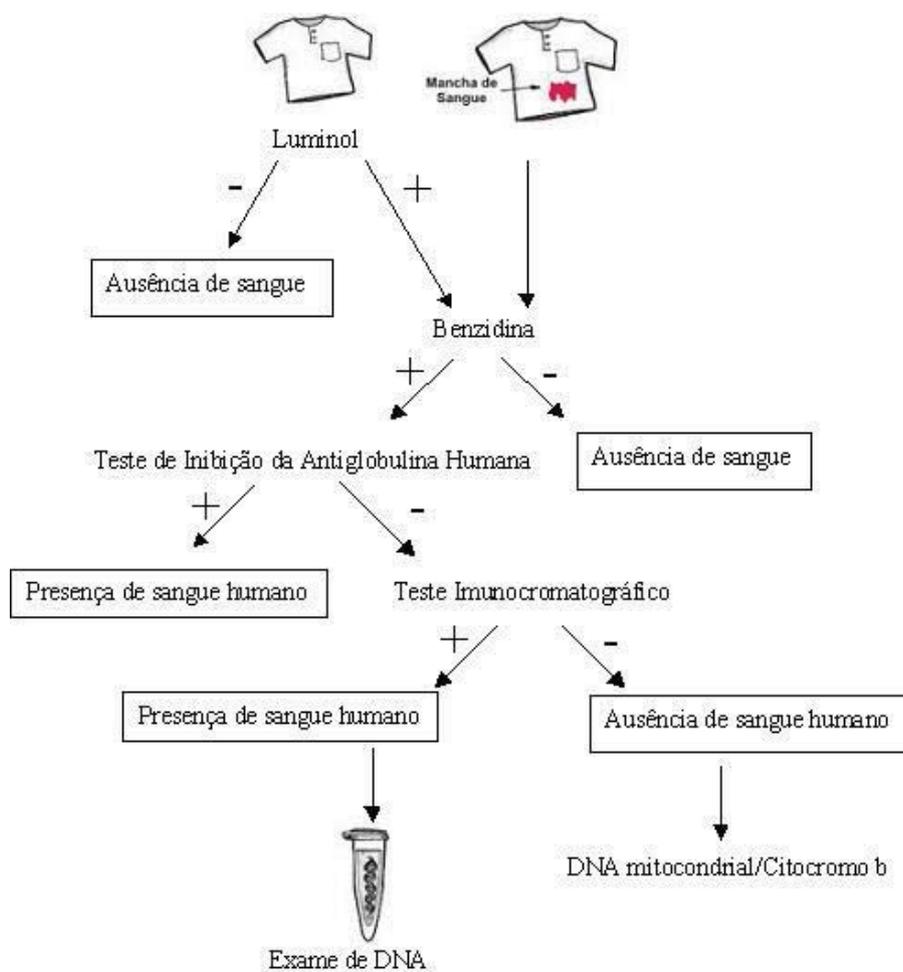


Figura 6 – Esquema da rotina dos testes realizados no Setor de Imunohematologia do Laboratório de Perícias do Instituto Geral de Perícias/RS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo busca avaliar os efeitos dos testes presuntivos para detecção de sangue sobre os métodos sorológicos para confirmação de sangue humano e sobre o exame de DNA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos testes presuntivos para detecção de sangue utilizando duas diferentes preparações de luminol, Bluestar[®] Forensic e benzidina sobre os métodos de inibição da antiglobulina humana e teste imunocromatográfico para hemoglobina humana.

- Determinar o efeito do luminol, Bluestar[®] Forensic e benzidina sobre o exame de DNA, em diferentes períodos após a aplicação dos reagentes.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

**EFFECT OF PRESUMPTIVE TESTS REAGENTS ON THE CONFIRMATORY
TESTS FOR HUMAN BLOOD AND DNA ANALYSIS USING REAL TIME
POLYMERASE CHAIN REACTION**

Manuscrito a ser submetido ao periódico "Journal of Forensic Sciences"

EFFECT OF PRESUMPTIVE TESTS REAGENTS ON THE CONFIRMATORY TESTS FOR HUMAN BLOOD AND DNA ANALYSIS USING REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Autorship: Juliana Piva de Almeida^{1,3}, Nadine Glesse^{1,2} and Cristina Bonorino³

¹ Instituto Geral de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Additional information and reprint requests:

Juliana Piva de Almeida

juliana-almeida@igp.rs.gov.br

Setor de Genética Forense/Instituto Geral de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul

Av. Azenha, 255.

Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP 90160-000

Phone: 00 55 51 3233-6477

ABSTRACT

Bloodstains constitute one of the major physical evidence in crime investigation. Diluted blood invisible to the naked eye can be detected through presumptive tests, however it can damage samples and prevent further processing such as DNA testing. In this study, we compared the effects of luminol (prepared by Weber, 1966), Luminol 16[®], Bluestar[®] and benzidine on the inhibition of human antiglobulin test, human hemoglobin immunochromatographic test and on the total human DNA concentration by Quantifiler[®] Human DNA Quantification, up to 120 days after sample treatment. Treatment with both luminol solutions and Bluestar[®] yielded positive results at immunologic tests, indicating non-interference with human blood confirmatory tests. However, samples treated with benzidine could not be further processed by serological tests. Also, DNA quantification showed that after 48 hours benzidine, but not luminol or Bluestar solution application, sample DNA was degraded. Luminol 16[®] caused DNA degradation already at 30 days. After 120 days, all reagents led to DNA degradation.

Keywords: forensic science, presumptive tests, bloodstains, DNA, serological tests, Bluestar[®] Forensic, luminol, benzidine.

INTRODUCTION

Blood detection in crime scenes, clothes of suspects or victims, apprehended objects or motor vehicles, constitutes one of the major physical evidences in criminal investigation, many times being decisive for crime elucidation. An adequate collection and preservation of the blood samples is critical to establish associations of the perpetrator with victim and crime scene. In an attempt to hide evidence, perpetrators can wash bloodstains, making them invisible to the naked eye. Latent blood can then be detected by presumptive tests, and these should not have an effect on the subsequent tests employed to determine human origin of the blood, as well as DNA analysis.

The literature available on presumptive blood detection techniques is somewhat variable. There is great diversity of experimental conditions, which makes it difficult to compare the use of reagents tested by different authors. For example, in the available studies with luminol, the most widely used presumptive test, different preparations of luminol and extraction methods are employed by different groups. They were centered on DNA analysis using Restriction Fragment Length Polymorphism (1) and STR loci (2-7). All of these studies report that luminol does not degrade DNA. Hochmeister *et al*, 1999, had shown that luminol containing sodium hydroxide can affect the performance of the Hexagon OBTI immunochromatographic test after 72 hours contact with bloodstains (8). Bluestar Forensic[®], a more recently developed alternative to luminol, has not had its effects over presumptive tests effects thoroughly studied; the few studies available indicate that it does not affect DNA in the sample (9, 10). However, none of these studies have used a quantitative method. Also, all of these studies had an endpoint of a few hours after Bluestar[®]

Forensic or Luminol use (2-7, 9, 11). Finally, benzidine, a substance with carcinogenic potential (12-14), is used in forensic labs in countries outside the United States, trusting that careful manipulation can prevent its deleterious effects. Very few studies have analyzed the effect of benzidine over presumptive tests. DNA could not be detected by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in bloodstains treated with benzidine diluted in glacial acetic acid (1). The aim of the present work is to provide a standardized evaluation of the effects of luminol (prepared by Weber, 1966), Luminol 16[®], Bluestar[®] Forensic and benzidine on the inhibition of human antiglobulin test, human hemoglobin immunochromatographic test and DNA genotyping.

MATERIALS AND METHODS

Samples

All bloodstains were prepared on white cloth (100% cotton) which was cut into squares of approximately 1cm x 1cm, previously autoclaved. A 2 μ L drop of venous blood (of the same donor for all times analyzed) was added to the squares of cloth and allowed to dry for 48 hours. The blood was not subject to any form of anticoagulant. All samples were stored at room temperature, to simulate conditions found in crime scenes. Controls were bloodstains without application of any reagent. For the immunological tests, sample size (n) = 20. For the DNA tests, n varied between 13 and 29.

Preparation of reagents

For the benzidine test, 0.2g of benzidine (Vetec Química Fina Ltda. Rua Pastor Manoel Avelino de Souza, 1021, Rio de Janeiro – RJ, Brazil) were dissolved in 90 mL of water and 10 mL of glacial acetic acid. One drop of benzidine solution 0,2% was added to the cloth. After ensuring that no color was developed, one drop of 3% hydrogen peroxide was added to the stain. Two luminol preparations were tested. One luminol solution was prepared as described by Weber (49). Luminol was purchased by Sigma-Aldrich Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA. The other luminol solution was Luminol 16[®] (Sirchie Finger Print Laboratories, 100 Hunter place, Youngsville, NC 27596, USA), prepared according to the manufacturer's recommendation. Bluestar[®] Forensic (ROC Import Group P.O., Monte Carlo 98005, Monaco) was prepared according to the manufacturer's guidelines. The method of application for the both luminol solutions and the Bluestar Forensic[®] was the same. Using a spray bottle, the reagents were applied on the samples in a

dark room to observe luminescence. The reagents were applied and the samples dried for 48 hours (when confirmatory and DNA quantification tests were performed), 7 days, 30 days or 120 days (when only DNA quantification testing was performed).

Confirmatory Tests

a. Inhibition of human antiglobulin test:

Each cloth fragment was placed in a test tube with eight drops of physiological buffered saline and left for 48h at a room temperature of approximately 20°C. After, a drop of antihuman globulin was added, and the tubes were incubated for 45 min in the same room, when two drops of a suspension of Rh+ human red cells previously sensibilized with anti-D antibody (Controcel[®], manufactured by Fresenius Hemocare Brasil Ltda, Rua Roque Gonzáles, 128 - Itapecerica da Serra, SP, Brazil) were added. Samples were incubated for another 15 minutes and then centrifuged at 13000 rpm for 15 seconds. Samples with no evidence of agglutination were considered positive for human blood.

b. Human hemoglobin immunochromatographic test:

The human hemoglobin immunochromatographic test (Hexagon OBTI[®]) was purchased from Human Gesellschaft fuer Biochemica und Diagnostica mbH, Germany. Each cloth square was placed in a test tube containing 1 mL Tris EDTA pH 7,5. After 30 minutes of maceration, 150 µL of buffer solution were applied to the test strip and the test result was read 10 min after sample addition. Two blue lines, one at the control position (C) and one at the test position (T) indicated that human blood was detected.

DNA extraction

DNA was extracted from the cloth squares using 300 μL of lysis buffer [100 mM NaCl, 10 mM EDTA (ethylenediaminetetracetic acid), 2% SDS (sodium dodecyl sulphate), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 24 μL of 20 mg/mL proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 48 μL of 1M DTT (dithiotreitol – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)]. Samples were incubated at 56°C for 12-24 hours. For DNA extraction, 600 μL of UltraPure[®] [phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added, vortexed and centrifuged for 7 min at 15000 X g in a microcentrifuge. The upper aqueous layer was placed inside a Microcon[®]-100 concentrator (Millipore, Billerica, MA, USA) and centrifuged at 500 x g until only a few microliters remained. Microcon[®]-100 filtering was repeated twice by adding 400 μL of DNA-free water. Fifty microliters of DNA-free water was added, the columns inverted and the retentate collected by centrifugation at 1000 x g for 3 min. The retentate was transferred into a new microtube and stored at -20°C .

DNA quantification

Total human DNA was measured in duplicate with Quantifiler[®] Human DNA Quantification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the 7500[®] Real-Time PCR System for Human Identification (Applied Biosystems).

Ethics and Statistical Analysis

This project was analyzed and approved by the Ethics Committee at Hospital São Lucas – PUCRS, number 08/04193. Data were tested for normality of distribution by a Kolmogorov-Smirnov test. Statistical comparisons between each of the groups were made by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunn's post-hoc test. A p -value of less 0.05 was considered statistically significant. Data analysis was performed with GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

The influence of benzidine, luminol, Luminol 16[®] and Bluestar[®] Forensic on the human antiglobulin and immunochromatographic tests can be seen in Tables 1 and 2, respectively. Benzidine applied over bloodstains prevented the human antiglobulin inhibition test (Table 1) in all 20 samples, while all the other reagents did not affect this exam compared to the untreated samples. For the immunochromatographic test (Table 2) samples treated with luminol and Bluestar[®] Forensic produced a positive result in less than a minute after application to the immunochromatographic device. Only two out of the twenty samples treated with benzidine produced a positive result, but only 20 minutes after application to the device.

The effect of the different presumptive tests on DNA quantification was evaluated at different times after applying the reagents. The results can be observed in Figure 1. DNA integrity in untreated samples is only altered 120 days after collection (Figure 1A) ($p < 0.001$). The same result was observed in samples treated with Luminol (Figure 1B) ($p < 0.001$) and Bluestar[®] Forensic (Figure 1D) ($p < 0.001$), indicating that these two reagents do not alter DNA amount over time up to this period. Surprisingly, treatment with Luminol 16[®] (Figure 1C) resulted in considerable DNA degradation already at day 7, with a significant difference at day 30 ($p < 0.05$). Finally, benzidine (Figure 1E) greatly degraded DNA already at 48h after treatment.

Figure 2 compares the effects of the different reagents on DNA quantification at a given time after treatment. At 48h (Figure 2A) benzidine resulted in expressive degradation of DNA compared to the control and the other reagents ($p < 0.001$), while neither luminol preparations nor Bluestar[®] Forensic differed from the control, or

among themselves. At 7 days, DNA in samples treated with Luminol 16[®] was more degraded not only than DNA in control samples, but also than DNA in samples treated with luminol and Bluestar[®] Forensic. At 30 days (2C) the same differences were observed, but at 120 days (2D) all of the tested reagents showed significant degradation compared to the untreated samples ($p < 0,05$). Samples treated with luminol and Bluestar[®] Forensic did not differ from each other but were different from the control ($p < 0,05$ for luminol and $p < 0,01$ for Bluestar[®]) as well as from samples treated with Luminol 16[®] ($p < 0,001$) and benzidine ($p < 0,001$).

DISCUSSION

Knowing the amount of human DNA from a stain will indicate the probability of obtaining a full STR profile and is thus critical for investigation of sample identification. Contrary to other findings, this study demonstrates that luminescent presumptive tests affect the amount of the sample DNA after a few months, leading to DNA degradation. However, with extremely small samples or when testing large numbers of samples, it may be necessary to expose the potential bloodstains directly to presumptive tests, and these also save time and money by prioritizing the samples sent for serological tests and DNA analysis. In this study, the best overall presumptive tests were luminol (prepared according Weber, 1966) and Bluestar® Forensic, because they degraded DNA to a lesser extent. Analysis of the Threshold Cycles (C_T) done with the Internal Control PCR (IPC) in the Quantifiler® reactions suggests that presumptive tests degrade DNA, but do not inhibit PCR, since IPC amplified as expected, presenting C_T between 20 and 30. Consequently, depending on the amount of biological material available, degradation caused by luminol and Bluestar® is less likely to prevent the obtention of a complete genetic profile. However, it should be remembered that these tests are used when there are no apparent stains, meaning that very little blood is likely to be recovered, and thus any degradation can be critical for subsequent genotyping. This hypothesis should be pursued by further studies. Our results also suggest that, when presumptive tests are performed, serological tests must be conducted in up to seven days, and DNA genotyping must be done in up to thirty days after the application of reagents. Finally, benzidine had the most critical effect over blood sample DNA, inducing degradation only hours after treatment, and this result is consistent with Hochmeister *et al*, data

who found that benzidine in acetic acid decreases the DNA by RFLP analysis (9). Consequently, benzidine should not be used when subsequent DNA analysis is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) and Instituto Geral de Perícias (IGP) from the State of Rio Grande do Sul.

REFERENCES

1. Hochmeister MN, Budowle B, Baechtel FS. Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from human blood and semen stains. *J Forensic Sci.* 1991 May;36(3):656-61.
2. Budowle B, Leggitt JL, Defenbaugh DA, Keys KM, Malkiewicz SF. The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA. *J Forensic Sci.* 2000 Sep;45(5):1090-2.
3. Gross AM, Harris KA, Kaldun GL. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci.* 1999 Jul;44(4):837-40.
4. Ponce AC, Seguí MA, Feucht MM, Pascual FAV. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. *Cuadernos de Medicina Forense.* 2002 Abril;28:33-6.
5. Della Manna A, Montpetit S. A novel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains. *J Forensic Sci.* 2000 Jul;45(4):886-90.
6. Barbaro A. Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents. *International Congress Series.* 2004;1261:631-3.
7. Garofano L, Pizzamiglio M, Marino A, Brighenti A, Romani F. A comparative study of the sensitivity and specificity of luminol and fluorescein on diluted and aged bloodstains and subsequent STRs typing. *International Congress Series.* 2006;1288:657-9.

8. Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, et al. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci.* 1999 May;44(3):597-602.
9. Tobe SS, Watson N, Daeid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci.* 2007 Jan;52(1):102-9.
10. Tringali G, Barbaro A, Insirello E, Cormaci P, Roccazzello AM. Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int.* 2004 Dec 2;146 Suppl:S177-81.
11. Tontarski KL, Hoskins KA, Watkins TG, Brun-Conti L, Michaud AL. Chemical enhancement techniques of bloodstain patterns and DNA recovery after fire exposure. *J Forensic Sci.* 2009 Jan;54(1):37-48.
12. Fregeau CJ, Germain O, Fourney RM. Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent profiler Plus fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody fingerprints. *J Forensic Sci.* 2000 Mar;45(2):354-80.
13. Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *J Forensic Sci.* 1991 Sep;36(5):1503-11.
14. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. *Canadian Society of Forensic Science.* 2006;39(3):81-100.
15. Weber K. The use of chemiluminescence of Luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med.* 1966;57(3):410-23.

TABLE LEGENDS

Table 1. Effect of presumptive tests over the test of inhibition of human antiglobulin.

Table 2. Effect of presumptive tests over the immunochromatographic test for human hemoglobin.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Comparison of DNA quantification over time in control samples (a), and samples treated with luminol (b), Luminol 16[®] (c), Bluestar[®] Forensic (d) and benzidine (e). KW = *p<0,05; ***p<0,001.

Figure 2. Comparison of DNA quantification in samples treated with different presumptive tests after 48 hours (a), 7 days (b), 30 days (C) and 120 days (D). KW = *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

TABLE 1

	Samples (n)	Positive	Negative
Control	20	20	0
Luminol	20	20	0
Luminol 16 [®]	20	20	0
Bluestar [®] Forensic	20	20	0
Benzidine	20	0	20

TABLE 2

	Samples (n)	Positive	Negative
Control	20	20	0
Luminol	20	20	0
Luminol 16 [®]	20	20	0
Bluestar [®] Forensic	20	20	0
Benzidine	20	2	18

FIGURE 1

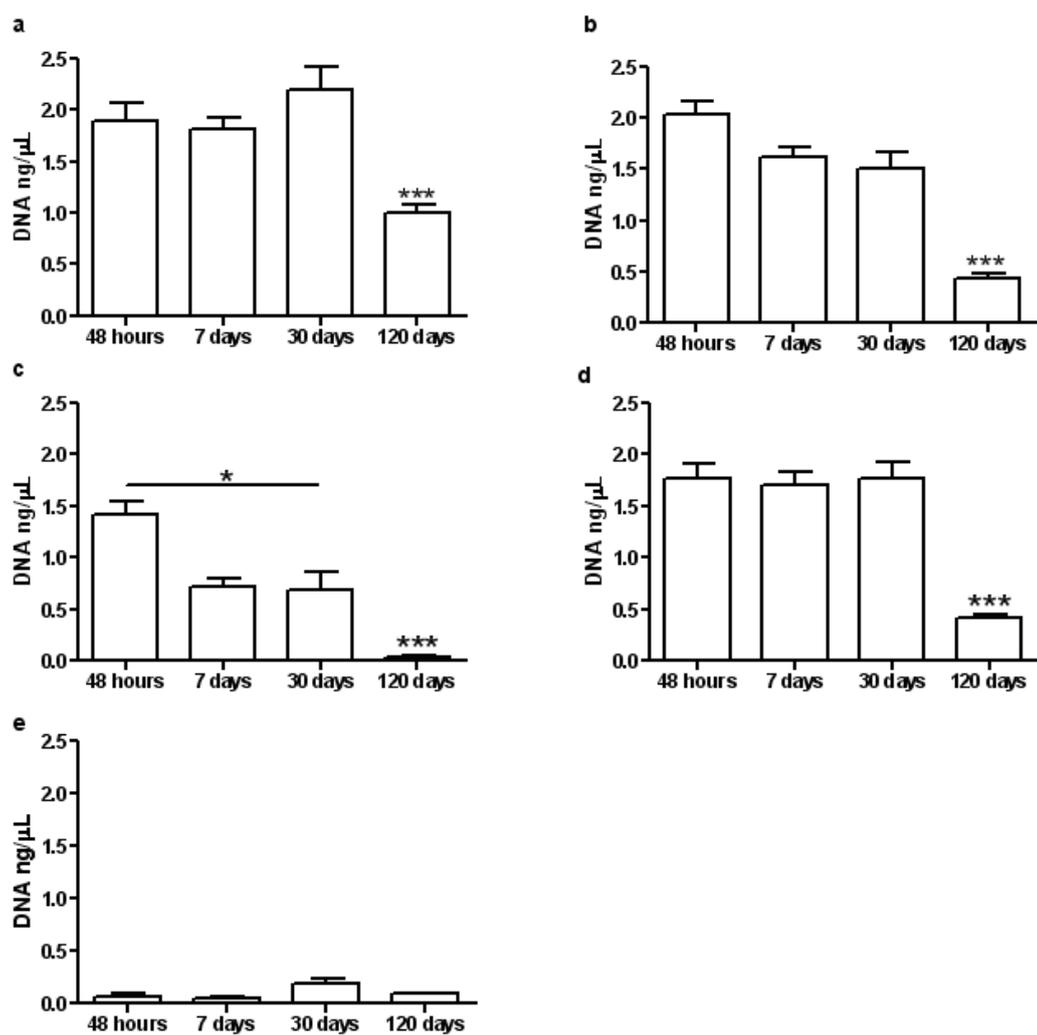
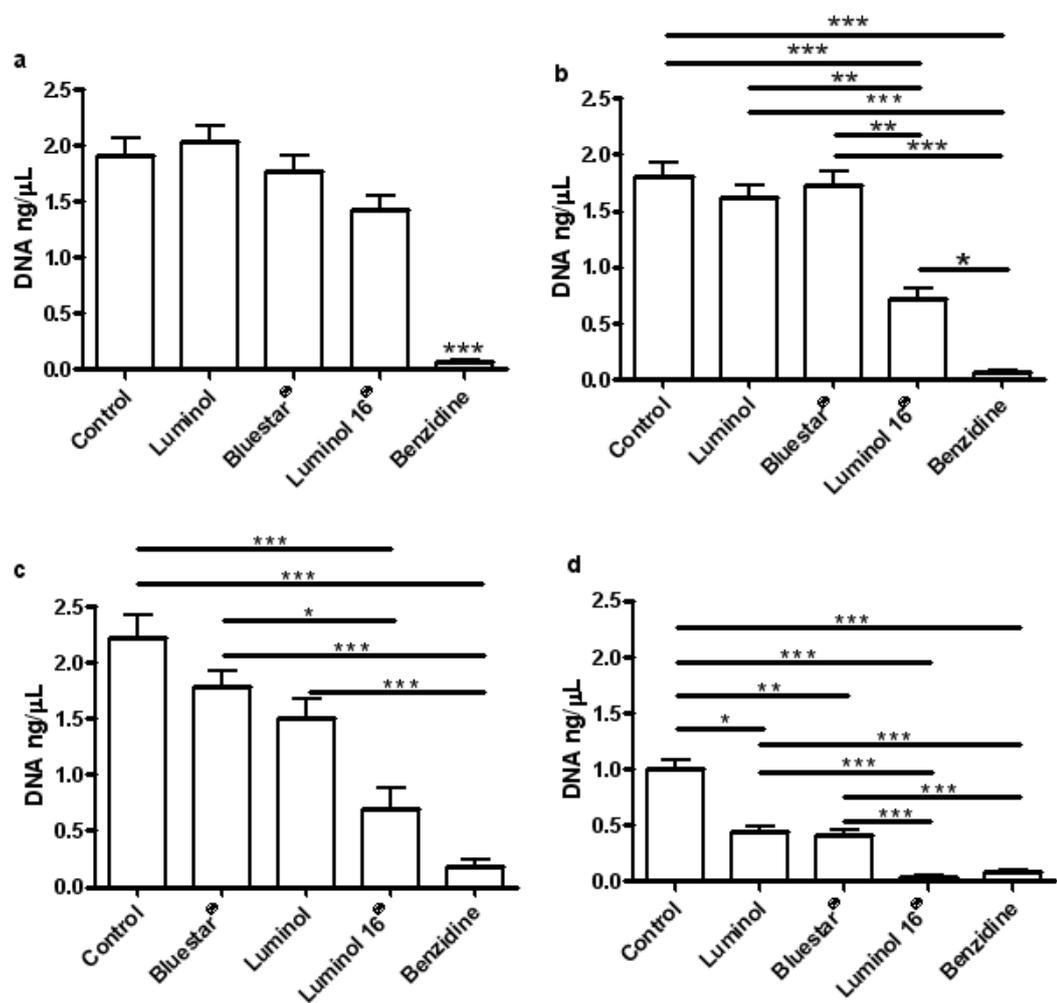


FIGURE 2



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo foi possível concluir que, entre os reagentes testados, mostraram-se mais adequados, em casos de amostras escassas, o Bluestar[®] Forensic e o luminol. Entretanto, caso os materiais sejam submetidos a estes testes, a extração de DNA deve ser realizada em até 30 dias após a aplicação das soluções, uma vez que, após 120 dias, há uma degradação significativa das moléculas de DNA, o que prejudica a obtenção de perfil genético satisfatório. Considerando-se que os testes quimioluminescentes geralmente são usados quando não há manchas aparentes, é provável que não haja grande quantidade de sangue presente nos objetos questionados. Dessa forma, qualquer degradação que ocorra pode inviabilizar o confronto genético com amostras de referência. Pelo mesmo motivo, desaconselha-se o uso de Luminol 16[®] nesse tipo de amostra, já que este, em 30 dias de contato, causou degradação significativa do DNA.

Em nosso estudo, a benzidina apresentou efeito deletério sobre os testes subseqüentes, degradando o DNA das manchas de sangue e inibindo os testes imunológicos. Contudo, sua importância não pode ser ignorada, por apresentar maior especificidade que os testes quimioluminescentes e maior sensibilidade que outros testes presuntivos de cor, como fenolftaleína e tetrametilbenzidina. O uso da benzidina deve portanto ser limitado a amostras com manchas visíveis ou com grandes extensões reveladas por reagentes quimioluminescentes, as quais não causarão prejuízo em serem descartadas. Isso evita o contato da porção da mancha que será submetida aos exames sorológicos ou genotipagem com os reagentes, preservando a integridade do material biológico.

Embora o Bluestar[®] Forensic e o luminol não tenham influenciado no resultado dos testes imunológicos, deve-se considerar que os experimentos foram conduzidos em 48 horas após a aplicação das soluções. Seus possíveis efeitos a longo prazo devem ser investigados.

Atualmente, no Laboratório do Instituto Geral de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul, as amostras escassas são submetidas diretamente a exame de DNA. O uso de testes presuntivos nesses materiais evitaria gastos desnecessários

de tempo e de reagentes, permitindo uma seleção das amostras a serem analisadas.

Os resultados obtidos através deste estudo serão de grande importância para a comunidade forense. Tais dados servirão para o estabelecimento de critérios na realização e escolha dos testes presuntivos a serem utilizados para a detecção de sangue em amostras criminais de natureza diversa. Objetiva-se a padronização do uso de reagentes quimioluminescentes para identificação de sangue em perícias realizadas em locais de crime, em amostras que tenham sido submetidas à lavagem, ou na rotina laboratorial, em materiais de grande superfície e de difícil visualização das manchas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
2. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2005.
3. Park SY, Yokoyama T, Shibayama N, Shiro Y, Tame JR. 1.25 Å resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms. *J Mol Biol.* 2006 Jul 14;360(3):690-701.
4. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther.* 2006 Aug;111(2):327-45.
5. Reeder BJ, Svistunenko DA, Cooper CE, Wilson MT. The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Dec;6(6):954-66.
6. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta.* 2007 May 15;72(3):896-913.
7. Laux DL. The detection of blood using luminol. In: James SH, editor. *Interpretation of bloodstain evidence at crime scenes.* Second ed. Hardcover: CRC Press; 1998.
8. Sawaya MCT, Rolim MRS. *Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório.* Curitiba: Juruá; 2004.
9. Hochmeister MN, Budowle B, Baechtel FS. Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from human blood and semen stains. *J Forensic Sci.* 1991 May;36(3):656-61.
10. Seah LH, Othman MI, Jaya P, Jeevan NH. DNA profilings on fabrics: an in-situ method. *International Congress Series.* 2004(1261):565-7.
11. Cox M. Effect of fabric washing on the presumptive identification of bloodstains. *J Forensic Sci.* 1990 Nov;35(6):1335-41.
12. Budowle B, Leggitt JL, Defenbaugh DA, Keys KM, Malkiewicz SF. The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA. *J Forensic Sci.* 2000 Sep;45(5):1090-2.

13. Tobe SS, Watson N, Daeid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci.* 2007 Jan;52(1):102-9.
14. Webb JL, Creamer JI, Quickenden TI. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence.* 2006 Jul-Aug;21(4):214-20.
15. Kent EJ, Elliot DA, Miskelly GM. Inhibition of bleach-induced luminol chemiluminescence. *J Forensic Sci.* 2003 Jan;48(1):64-7.
16. Quickenden TI, Creamer JI. A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence.* 2001 Jul-Aug;16(4):295-8.
17. Creamer JI, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson P. A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence.* 2003 Jul-Aug;18(4):193-8.
18. Creamer JI, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel RA. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence.* 2005 Nov-Dec;20(6):411-3.
19. Quickenden TI, Cooper PD. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence.* 2001 May-Jun;16(3):251-3.
20. Castello A, Frances F, Verdu F. Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: more about the drying time effect. *Talanta.* 2009 Feb 15;77(4):1555-7.
21. King R, Miskelly GM. The inhibition by amines and amino acids of bleach-induced luminol chemiluminescence during forensic screening for blood. *Talanta.* 2005 Aug 15;67(2):345-53.
22. Marquette CA, Blum LJ. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem.* 2006 Jun;385(3):546-54.
23. Gross AM, Harris KA, Kaldun GL. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci.* 1999 Jul;44(4):837-40.
24. Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, et al. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci.* 1999 May;44(3):597-602.
25. Laux DL. Effects of luminol on the subsequent analysis of bloodstains. *J Forensic Sci.* 1991 Sep;36(5):1512-20.
26. Grispino RRJ. The effect of luminol on the serological analysis of dried human bloodstains. *Crime Laboratory Digest.* 1990;17(1):13-23.

27. Ponce AC, Seguí MA, Feucht MM, Pascual FAV. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Cuadernos de Medicina Forense. 2002 Abril;28:33-6.
28. Della Manna A, Montpetit S. A novel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains. J Forensic Sci. 2000 Jul;45(4):886-90.
29. Fregeau CJ, Germain O, Fourney RM. Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent profiler Plus fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody fingerprints. J Forensic Sci. 2000 Mar;45(2):354-80.
30. Barbaro A. Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents. International Congress Series. 2004;1261:631-3.
31. Garofano L, Pizzamiglio M, Marino A, Brighenti A, Romani F. A comparative study of the sensitivity and specificity of luminol and fluorescein on diluted and aged bloodstains and subsequent STRs typing. International Congress Series. 2006;1288:657-9.
32. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. Canadian Society of Forensic Science. 2006;39(3):81-100.
33. Dilbeck L. Use of Bluestar Forensic in lieu of luminol at crime scenes. Journal of Forensic Identification. 2006;56(5):706-14.
34. [cited 2008 December]; Available from: <http://www.bluestar-forensic.com/gb/bluestar.php>.
35. Tontarski KL, Hoskins KA, Watkins TG, Brun-Conti L, Michaud AL. Chemical enhancement techniques of bloodstain patterns and DNA recovery after fire exposure. J Forensic Sci. 2009 Jan;54(1):37-48.
36. Gaensslen RE. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry. Washington: Superintendent of Documents, US Government Printing Office, DC; 1983.
37. Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. J Forensic Sci. 1976 Oct;21(4):816-21.
38. Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. J Forensic Sci. 1991 Sep;36(5):1503-11.
39. Josephy PD, Eling TE, Mason RP. Co-oxidation of benzidine by prostaglandin synthase and comparison with the action of horseradish peroxidase. J Biol Chem. 1983 May 10;258(9):5561-9.

40. Chen SC, Kao CM, Huang MH, Shih MK, Chen YL, Huang SP, et al. Assessment of genotoxicity of benzidine and its structural analogues to human lymphocytes using comet assay. *Toxicol Sci.* 2003 Apr;72(2):283-8.
41. Verdu Pascual FA, Gisbert Grifo MS. Investigation of bloodstains: false negative results of the benzidine test. *Forensic Sci Int.* 1995 Jan 30;71(2):85-6.
42. Derobert L, Vacher J, Giaccone P. [New contribution to the technic of human blood identification with antiglobulin inhibition.]. *Ann Med Leg Criminol Police Sci Toxicol.* 1957 May-Jun;37(3):162-4.
43. Vacher J, Sutton E, Derobert L, Moullec J. [New method of examination of human origin of blood stains; inhibition of antiglobulin.]. *Ann Med Leg Criminol Police Sci Toxicol.* 1955 Jan-Feb;35(1):29-33.
44. Allison AC, Morton JA. Species specificity in the inhibition of antiglobulin sera; a technique for the identification of human and animal bloods. *J Clin Pathol.* 1953 Nov;6(4):314-9.
45. Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. *J Forensic Sci.* 2008 May;53(3):687-9.
46. Hermon D, Shpitzen M, Oz C, Glattstein B, Azoury M, Gafny R. The use of the Hexagon OBTI test for detection oh human blood at crime scenes and on items of evidence. Part I: Validation studies and implementation. *Journal of Forensic Identification.* 2003;53(5):566-75.
47. Tringali G, Barbaro A, Insirello E, Cormaci P, Roccazzello AM. Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int.* 2004 Dec 2;146 Suppl:S177-81.
48. Green RL, Roinestad IC, Boland C, Hennessy LK. Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J Forensic Sci.* 2005 Jul;50(4):809-25.