

MÁSTER EN GENÉTICA, FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE

Trabajo Final de Máster



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

**VIABILIDAD DEL USO DE TIRAS DE ORINA
PARA LA DETECCIÓN DE SANGRE EN ESCENAS
DEL CRÍMEN**

Estudiante: Ariadna Lechón Lara

Tutores académicos: Raúl Beltrán Debón y Xavier Montané Montané

Universidad Rovira i Virgili, junio del 2025

RESUMEN

La sangre es una de las evidencias biológicas más relevantes en el análisis forense, tanto por su frecuencia como por la valiosa información que puede aportar de una escena del crimen. La correcta identificación de sangre permite orientar la investigación, reconstruir los hechos y vincular a las personas implicadas a través del análisis genético. En este contexto, las pruebas presuntivas y confirmatorias son herramientas clave en la inspección ocular por su rapidez y facilidad de uso, aunque su fiabilidad puede verse afectada por diversos factores del entorno.

Este trabajo propone la evaluación de tiras reactivas de análisis de orina, habitualmente utilizadas en el ámbito clínico, como posible herramienta en criminalística. Para ello, se realiza un estudio comparativo con el test OBTI® de Bluestar, un inmunoensayo confirmatorio actualmente empleado por los Mossos d'Esquadra. La metodología se ha estructurado en tres fases experimentales: un estudio de especificidad frente a sustancias interferentes; un estudio de sensibilidad; y simulaciones de condiciones reales de escena del crimen, incluyendo exposición al calor, radiación UV, congelación y envejecimiento de la muestra. Además, en todos los ensayos se incorporaron controles positivos y negativos para validar los procedimientos.

Las conclusiones del trabajo ponen de manifiesto la importancia de valorar nuevos métodos accesibles y rápidos para el cribado de sangre en el lugar de los hechos. Aunque las tiras reactivas no sustituyen a los tests confirmatorios, su uso complementario puede optimizar la eficiencia del análisis preliminar en contextos forenses reales.

Palabras clave: detección de sangre, pruebas forenses, tiras de uroanálisis, test OBTI.

ABSTRACT

Blood is one of the most relevant biological traces in forensic analysis, both due to its frequent presence and the valuable information it can provide from a crime scene. Proper identification of blood helps guide the investigation, reconstruct events, and link individuals involved through genetic analysis. In this context, presumptive and confirmatory tests are key tools during on-site inspections because of their speed and ease of use, although their reliability can be affected by various environmental factors.

This study proposes the evaluation of urine reagent strips, commonly used in clinical settings, as a potential tool in forensic science. To this end, a comparative study was carried out with the Bluestar® OBTI test, a confirmatory immunoassay currently used by the Mossos d'Esquadra. The methodology was structured into three experimental phases: a specificity study involving interfering substances; a sensitivity study; and simulations of real crime scene conditions, including exposure to heat, UV radiation, freezing, and sample aging. Positive and negative controls were included in all experiments to validate the procedures.

The conclusions of this study highlight the importance of exploring new accessible and rapid methods for on-site blood screening. While reagent strips do not replace confirmatory tests, their complementary use may enhance the efficiency of preliminary analysis in real forensic scenarios.

Keywords: blood detection, forensic analysis, Urine test strips, OBTI test.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. La sangre y sus componentes principales.....	5
1.2. Métodos de detección.....	6
1.3. Principios operativos.....	7
1.3.1. Tiras reactivas de urianálisis.....	7
1.3.2. Inmunocromatografía.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1. Estudio de especificidad.....	14
3.2. Estudio de sensibilidad.....	14
3.3. Simulaciones de posibles casos reales.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Control positivo y control negativo.....	18
4.2. Estudio de especificidad.....	18
4.3. Estudio de sensibilidad.....	19
4.4. Simulaciones de posibles casos reales.....	20
4.4.1. Antigüedad a temperatura ambiente.....	20
4.4.2. Exposición a la luz solar (radiación UV).....	20
4.4.3. Congelación a -20°C.....	20
4.4.4. Exposición a alta temperatura (100°C).....	20
5. CONCLUSIONES.....	22
6. BIBLIOGRAFÍA.....	23
7. ANEXOS.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La sangre y sus componentes principales

La sangre es uno de los fluidos biológicos más frecuentes e importantes como evidencia física en investigaciones de hechos violentos. Hallar manchas de sangre en una escena, aporta información muy valiosa que puede ser decisiva en la resolución del crimen.[1]

Además, la sangre tiene la capacidad de aportar una gran cantidad de información a través de su análisis. Se trata de una de las evidencias más idóneas para la obtención de material genético en el laboratorio. A partir de las manchas de sangre localizadas en la escena del crimen, es posible extraer perfiles genéticos tanto de la víctima/s como del sospechoso/s. Esta información genética puede ser crucial para establecer vínculos entre los implicados o situar a un individuo en el lugar de los hechos. Asimismo, el análisis de la sangre permite obtener datos relevantes sobre la dinámica del crimen, el número de personas involucradas, el tiempo transcurrido desde el suceso y otros aspectos determinantes para la resolución del caso. [4,5]

La sangre es un fluido corporal que se mueve constantemente a través del cuerpo y realiza muchas funciones integrales. La sangre se compone de dos partes principales: la porción líquida y la porción celular. La porción líquida está compuesta por el plasma (suma de proteínas, sales, lípidos y agua) que constituye más de la mitad de la sangre y su función principal es asegurar que los componentes celulares de la sangre circulen por el cuerpo. Los componentes celulares incluyen dos tipos de células (rojas y blancas), y fragmentos celulares llamados plaquetas. [4, 9]

Las plaquetas son fragmentos de células responsables de la coagulación minimizando la pérdida de sangre cuando se produce una lesión. [4, 9]

Los glóbulos blancos o leucocitos forman parte del sistema inmunitario y su función principal es proteger al cuerpo de infecciones. Estas células tienen ADN nuclear, lo que permite obtener un perfil genético único a través de su análisis.[4, 9]

Por último, los glóbulos rojos o eritrocitos, son células esféricas sin ADN responsables del transporte de oxígeno por todo el cuerpo que contienen millones de moléculas de hemoglobina. La hemoglobina es el componente de la sangre que más interesa a los científicos forenses para la detección de sangre, especialmente las moléculas hemo (ferroprotoporfirina) que contienen las cuatro cadenas polipeptídicas. [9]

1.2. Métodos de detección

El objetivo principal de la identificación de fluidos corporales es descubrir el fluido específico presente e identificar quién lo depositó en la escena mediante análisis de ADN. Para lograr ese objetivo el paso clave es la correcta recogida de muestras en escenas del crimen. [3]

En el pasado, el perito era el encargado de recolectar las muestras de posibles fluidos biológicos de la escena. Esto lo hacía sin ejecutar ningún tipo de prueba científica que pudiera confirmar que se trataba de un indicio real. Como consecuencia, al evaluar todas las muestras en el laboratorio se encontraban que una gran parte de ellas no eran de interés forense, gastando tiempo y recursos del Estado.[2] Por otro lado, tampoco se detectaban aquellos indicios que no se veían a simple vista, ya sea porque han estado limpiados o mezclados con otros componentes del lugar.

Es indispensable detectar todos los indicios relevantes de la escena del crimen para que puedan ser utilizados como pruebas sustanciales en el juicio. Por estas razones, en las últimas décadas se han estudiado y desarrollado diversas estrategias para la identificación tanto de sangre como de saliva, semen y otros fluidos.

Hasta el momento la manera de proceder de la policía científica para la detección de sangre comienza con un examen visual de la evidencia que contiene la presunta mancha. Se realiza a simple vista bajo luz ambiental para determinar si existen manchas características de color marrón rojizo, escamosas o costrosas. [9]

Si no se observa ninguna mancha, se emplea una prueba presuntiva u orientativa. Estas suelen ser pruebas catalíticas de color, rápidas, sensibles y de fácil uso. Consisten en un reactivo incoloro que produce un producto coloreado al exponerse a las moléculas de hemo. [12]Permiten saber si la sustancia analizada puede ser sangre o no, pero sin distinción de si es humana o no. Las pruebas orientativas más utilizadas actualmente son: el luminol y el Combur test.

Si el resultado de la prueba es positivo para sangre, la muestra se somete a una prueba confirmatoria. Como el mismo nombre indica, permiten confirmar si el fluido se trata de sangre humana. Este paso es obligatorio antes de proceder a la tipificación del ADN.[9]

En las últimas décadas, gracias a las nuevas tecnologías y áreas de investigación, se han ido desarrollando varias técnicas confirmatorias:

- Ensayos inmunocromatográficos (CI).
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).[13]
- Electroforesis capilar (CE) [14]
- Espectrometría de masas (MS) [15]

- Espectrometría Raman [16]
- ATR FT-IR (transformada de Fourier de reflexión total atenuada-infrarrojo) [17]
- NIR (infrarrojo cercano) [18]
- Análisis de ARN y metilación del ADN [19]

El método ideal para los investigadores forenses debería cumplir los siguientes requisitos: simplicidad, sensibilidad, especificidad, robustez, corta duración y bajo coste. Lamentablemente, la instrumentación y configuración que requieren la mayoría de los métodos anteriores imposibilitan su uso de forma rutinaria. Las técnicas que parecen más prometedoras son la espectrometría Raman, ATR FT-IR y NIR y aunque son las únicas no destructivas, aún no están completamente validadas para el empleo en casos forenses. [6]

Por estas razones el método más utilizado y el que actualmente se emplea por la policía forense es la inmunocromatografía.

1.3. Principios operativos

1.3.1. Tiras reactivas de urianálisis

Las tiras reactivas de análisis de orina permiten la detección cualitativa y semicuantitativa de diferentes parámetros de una muestra urinaria, entre ellos la presencia de sangre. Con este test se detecta tanto la presencia de hemoglobina como la de eritrocitos.

La detección de sangre se basa en la actividad peroxidasa del grupo hemo presente en la hemoglobina o en la mioglobina. Esta actividad cataliza la oxidación de un cromógeno (generalmente un compuesto tipo tetrametilbenzidina) en presencia de peróxido de hidrógeno. Cuando hay hemoglobina (o eritrocitos intactos que la contienen), se produce un cambio de color característico en el área reactiva de la tira, que suele ir del amarillo al verde o azul-verdoso. La hemoglobina libre o mioglobina reaccionan de forma uniforme sobre toda la zona reactiva y los eritrocitos producen puntos verdes aislados. [6]

Un ejemplo de estas tiras en el ámbito forense es la prueba Combur de Roche, desarrollada inicialmente para detectar sangre en orina. Sus ventajas principales son la rapidez, resultados en 60 segundos, y la alta sensibilidad. Por el contrario, estas tiras no son específicas para la sangre humana.

Algunas verduras, como la patata o el tomate, muestran una alta actividad peroxidasa, al igual que la hemoglobina, por lo que se pueden registrar falsos positivos. De la misma manera, algunos reactivos con fuerte poder oxidante (como blanqueantes, oxígeno activo[8]) también pueden producir un falso positivo. [6]

1.3.2. Inmunocromatografía

La mayoría de las pruebas inmunocromatográficas (CI) disponibles actualmente, se desarrollaron inicialmente para identificar la hemoglobina humana en heces como herramienta de detección del cáncer de colon. [6] Algunos de los kits comerciales para fines forenses son: ABACard[®] Hematrace[®], Hexagon OBTI, RSID TM blood, OBTI[®] Bluestar.

Las pruebas CI combinan dos técnicas: la separación de moléculas según su capacidad de migrar sobre soportes sólidos por flujo capilar y la identificación de las moléculas diana mediante la reacción antígeno-anticuerpo. [6]

La tira reactiva inmunocromatográfica contiene un pocillo de muestra, una región de prueba (T) y una región de control (C).

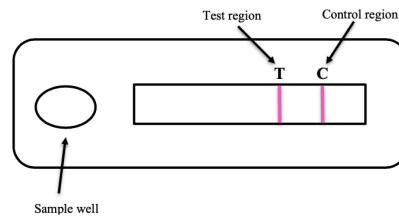


Figura 1. Regiones de la tira inmunocromatográfica.

El pocillo de muestra contiene anticuerpos monoclonales móviles, unidos a una molécula de colorante, que se unen al antígeno diana de la sangre. El par antígeno-anticuerpo se difunde hacia el otro extremo de la tira reactiva en un corto período de tiempo.

La región de prueba contiene anticuerpos policlonales inmóviles. Si el antígeno diana está presente en la muestra, el par antígeno-anticuerpo se unirá a los anticuerpos en la región de prueba y se detendrá allí. A medida que más pares antígeno-anticuerpo se unen a la región de prueba, aparecerá una banda coloreada debido al mayor número de moléculas de colorante presentes.

Finalmente, los anticuerpos monoclonales móviles del pocillo de muestra que no se hayan unido al antígeno diana continuarán difundiéndose y acumulándose en la región de control, donde se unirán a anticuerpos policlonales inmóviles específicos para ellos y formarán una segunda banda coloreada.[9]

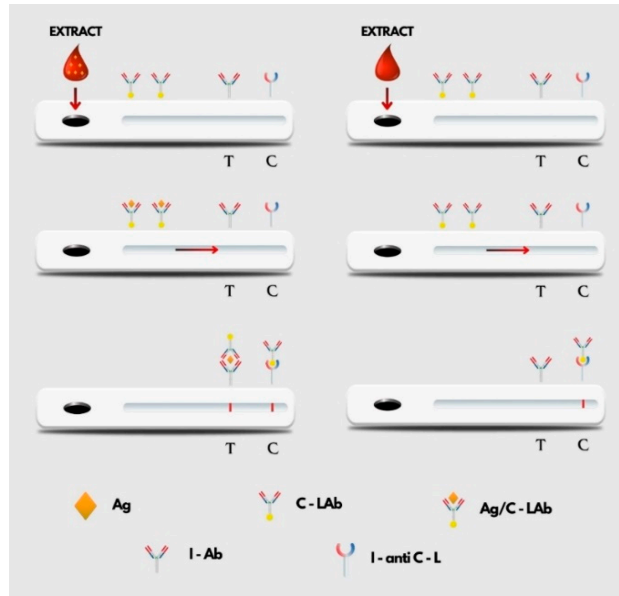


Figura 2. Representación del ensayo de CI. Resultado positivo a la izquierda y negativo a la derecha.

- **Ventajas:** son kits muy sencillos que pueden realizarse directamente en la escena del crimen con equipos fácilmente disponibles. La prueba es simple y, en condiciones estándar, requiere menos de una o dos horas. Además, su disponibilidad comercial es grande y a un coste inferior a 10€ por prueba. [6]
- **Desventajas:** pueden presentar reactividad cruzada con sangre de algunos animales.

Según las especificaciones del test, se pueden llegar a detectar cantidades mínimas de hemoglobina humana, siendo el límite de detección 50 ng/ml Hb. Por lo que su sensibilidad es muy alta.[7] Por otro lado, la concentración máxima que se analiza de forma correcta es de 10.000µL/ml en la zona de transferencia. [10]

Detecta subtipos HbA1, HbA2, HbF(positivo con sangre del cordón umbilical), HbS primate (gorila, langur y mustélidos). La sangre del tejón reacciona débilmente en una concentración de 200µL/ml. La sangre de caballo también reacciona débilmente en una concentración de 500µL/ml. Teniendo esto en cuenta, su especificidad es alta y la posibilidad de reacción cruzada (con el riesgo de falsos positivos) es tan baja que puede considerarse insignificante. [10]

Sin embargo, debemos ser conscientes de que se pueden dar falsos positivos o falsos negativos. Estas interferencias pueden deberse a la presencia del componente identificador en otros fluidos o tejidos corporales, materiales vegetales o animales, almacenamiento inadecuado, etc. Asimismo, se pueden dar falsos negativos debido al llamado *hook effect* o efecto gancho de alta dosis. Este se produce cuando hay un exceso de antígeno libre de anticuerpos en el pocillo de muestra que se difunden más rápido uniéndose a los anticuerpos inmóviles en la región de prueba. Cuando los pares antígeno + anticuerpo (y

colorante) llegan, no quedan anticuerpos policlonales disponibles, por lo que la banda no se visualiza a pesar de la presencia del antígeno objetivo.[9]

Por último, la composición química de la prueba presuntiva (como el luminol), los detergentes y el lavado también pueden promover resultados falsos negativos en situaciones particulares. [9]

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es evaluar la aplicabilidad de tiras reactivas de análisis de orina para la detección de sangre en escenas del crimen.

Para lograr este objetivo, se realiza una comparación de estas tiras con el test usado actualmente por los Mossos d'Esquadra, el test OBTI® de Bluestar. Los objetivos específicos propuestos son los siguientes.

- Comparar tanto la especificidad como la sensibilidad de ambos procedimientos.
- Analizar los falsos positivos más comunes.
- Evaluar el rendimiento de ambos tests sometiendo las muestras a distintos tratamientos de degradación que puedan afectar a la integridad de la sangre y al resultado de las pruebas.
- Determinar la viabilidad del uso de las tiras reactivas como herramienta auxiliar o alternativa en el trabajo de campo forense.

3. METODOLOGÍA

Para cumplir con los propósitos establecidos se llevan a cabo tres líneas experimentales de manera simultánea: un estudio de la especificidad, de la sensibilidad y de simulación de posibles casos reales.

Toda la parte experimental se realiza con sangre humana fresca extraída de un único donante sano, siguiendo las normativas éticas correspondientes. La sangre fue recolectada sin anticoagulante y se almacenó a una temperatura de 4 grados durante 14 días.

Seguidamente se describen los procedimientos a seguir para la aplicación de los dos métodos de detección de sangre a analizar en este estudio. Estos se llevan a cabo siguiendo las indicaciones de sus respectivas fichas técnicas, adaptados al contexto experimental forense planteado en este trabajo.

- **Test OBTI® Bluestar.** Se recoge la muestra de sangre a estudiar con un hisopo humedecido en agua destilada y se deposita en el interior del tubo de extracción el cual contiene tampón Tris a pH 7,8. Se facilita la extracción con movimientos rotatorios del hisopo dentro del líquido y dejar a temperatura ambiente durante mínimo 60 minutos. Retirar el soporte del test de su sobre y colocar sobre una superficie plana. Transferir solamente 3 gotas del líquido de transferencia/transporte en la zona circular marcada con una S. Interpretar el resultado entre los 3 y los 10 minutos después de haber echado el líquido, no leer pasados los 10 minutos porque puede ser no válido.[10]

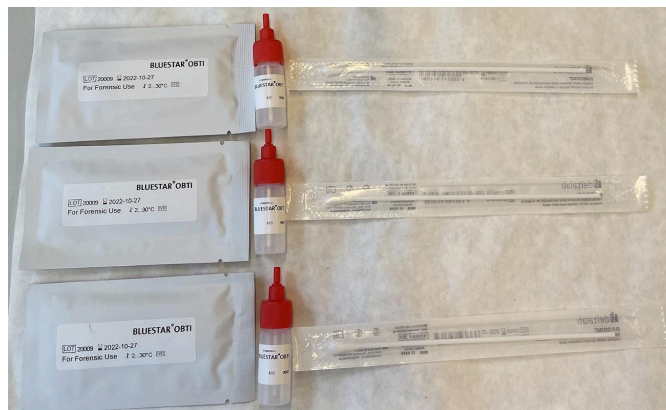


Figura 3. Materiales necesarios para la realización del test: hisopo, tubo de extracción con tampón y tira reactiva.

- **Tiras reactivas para urianálisis.** Las tiras, la muestra y los controles para este test deben encontrarse a temperatura ambiente (15-30°C) antes de empezar con el procedimiento. Se recoge la muestra de sangre a estudiar con un hisopo humedecido en agua destilada y se deposita en el interior del tubo de extracción el cual contiene agua destilada. Facilitar la extracción con movimientos rotatorios del hisopo dentro

del líquido. Una vez homogeneizada la solución, transferir a la tira de urianálisis 10µL de esta. Interpretar el resultado del área correspondiente a la hemoglobina/eritrocitos después de 60 segundos comparando con la carta de colores especificada en el recipiente que contiene las tiras. Nunca leer los resultados después de los 2 minutos, ya que no son válidos. [11]

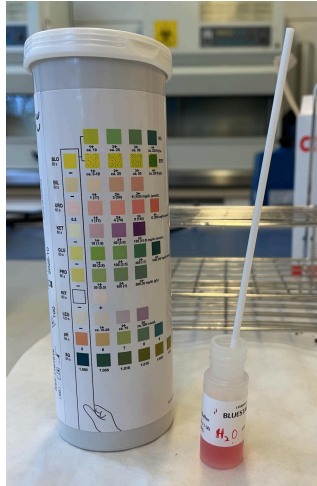


Figura 4. Materiales necesarios para la realización del test: tiras de uroanálisis, hisopo y tubo de extracción con agua destilada.

En todos los experimentos realizados se incluyeron controles positivos y negativos, con el objetivo de validar la fiabilidad de los resultados obtenidos y asegurar el correcto funcionamiento de ambos métodos de detección.

- El **control positivo** consiste en muestras de sangre humana fresca aplicadas directamente sobre el líquido de extracción adecuado y analizadas por triplicado (3 réplicas) en cada experimento. Estos controles permiten confirmar que tanto el test OBTI como las tiras reactivas eran capaces de detectar eficazmente la presencia de sangre en condiciones óptimas.

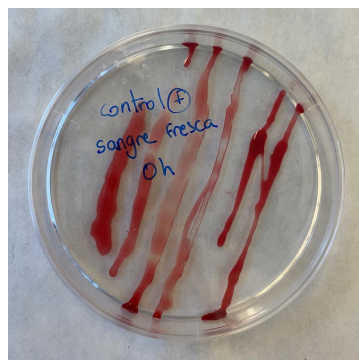


Figura 5. Muestra de sangre para control positivo.

- En cuanto a los **controles negativos**, se utilizan únicamente las dos soluciones diferentes según el método aplicado (sin adición de sangre humana): tampón OBTI® para los ensayos con el test OBTI® Bluestar, y agua destilada para los análisis con tiras reactivas de orina. Ambos casos se realizan por triplicado, garantizando así que no se produzcan falsos positivos debido a interferencias de los reactivos o del procedimiento.

3.1. Estudio de especificidad

La finalidad de esta fase es evaluar la capacidad de discriminación de ambos métodos para detectar exclusivamente sangre humana evitando reacciones cruzadas con otras sustancias biológicas o no biológicas que puedan hallarse en una escena del crimen. Como se ha mencionado anteriormente, los falsos positivos más comunes hallados por la policía científica son los productos de limpieza más comunes, como la lejía o los detergentes. Por esta razón se ha decidido estudiar: la lejía y el oxígeno activo (también llamado percarbonato sódico) y jugo de patata, ya que estudios recientes han detectado interferencias/reacciones inespecíficas con los tests basados en actividad peroxidasa.

Por un lado, los tres elementos se someten a los tests de manera directa, es decir, sin adición de sangre. Se añaden 10µL de producto a testar a los tubos de extracción adecuados. Pasados los 60 minutos se realizan los tests siguiendo el protocolo establecido, llevando a cabo 3 réplicas para descartar cualquier posibilidad de azar.

Por otro lado, se realiza un análisis de estos elementos como si se tratase de una posible escena real. Para esto se depositan diferentes gotas de sangre en una superficie lisa, como si se tratase de sangre salpicada en el suelo. Una vez secas, se limpian con lejía y con oxígeno activo. A los pocos segundos se toman muestras de los lugares donde estaban dichas manchas con un hisopo humedecido en agua destilada y se someten a ambos tests.

3.2. Estudio de sensibilidad

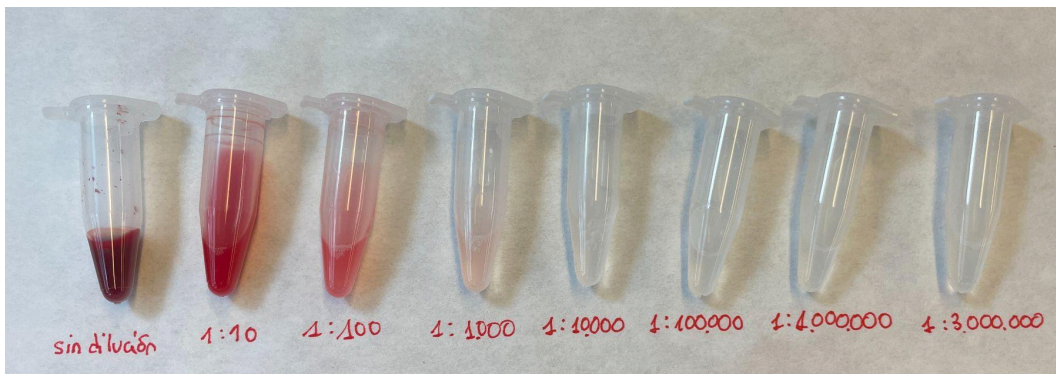
En esta etapa se evalúa la capacidad de detección de concentraciones bajas de sangre con la finalidad de determinar el LOD (*limit of detection*) de cada test. En el caso del OBTI® Bluestar el LOD según el fabricante es de 50 ng/mL.

Se preparan diluciones seriadas de sangre humana en tampón para el test OBTI® y en agua destilada para las tiras de urianálisis. En la siguiente tabla se recogen las diferentes diluciones y la concentración de Hemoglobina respectiva, teniendo en cuenta que la sangre a testar contiene 155 g/L de hemoglobina según un informe médico actual.

Tabla 1. Conjunto de diluciones y concentraciones en g/L y ng/mL.

Sin dilución	155 g/L Hb	$1,55 \times 10^8$ ng/mL Hb
Dilución 1:10	15,5 g/L Hb	$1,55 \times 10^7$ ng/mL Hb
Dilución 1:100	1,55 g/L Hb	$1,55 \times 10^6$ ng/mL Hb
Dilución 1:1.000	$1,55 \times 10^{-1}$ g/L Hb	$1,55 \times 10^5$ ng/mL Hb
Dilución 1:10.000	$1,55 \times 10^{-2}$ g/L Hb	$1,55 \times 10^4$ ng/mL Hb
Dilución 1:100.000	$1,55 \times 10^{-3}$ g/L Hb	$1,55 \times 10^3$ ng/mL Hb
Dilución 1:1.000.000	$1,55 \times 10^{-4}$ g/L Hb	155 ng/mL Hb
Dilución 1:3.000.000	$1,55 \times 10^{-5}$ g/L Hb	15,5 ng/mL Hb

Cabe destacar que estas concentraciones son estimaciones teóricas basadas en la dilución de sangre completa, sin considerar posibles pérdidas durante la manipulación o adherencias al recipiente.

**Figura 6.** Diluciones seriadas de sangre humana en tampón Tris.

3.3. Simulaciones de posibles casos reales

En esta última fase el objetivo es probar ambos tests en posibles escenarios de crímenes reales en los que pueden encontrarse restos biológicos. A menudo, la sangre hallada en una escena criminal no se conserva en condiciones óptimas, lo que puede afectar de forma significativa al rendimiento de los tests de detección. Por tanto, es fundamental evaluar la robustez y fiabilidad de los métodos seleccionados frente a estos factores externos.

Las cuatro condiciones simuladas son las siguientes:

- **Antigüedad** de la mancha almacenada **a temperatura ambiente**: se simula un escenario donde la sangre ha permanecido durante días, meses o incluso años expuesta al aire sin conservación específica. Por lo que la degradación progresiva de

los componentes celulares y proteicos de la sangre puede comprometer su detección, especialmente si los restos son muy antiguos. Esto es habitual en crímenes en espacios abandonados, lugares en los que el crimen no fue descubierto de inmediato, o escenas en interiores sin alteraciones evidentes durante largos períodos de tiempo.

- **Exposición a la luz solar (radiación UV):** al aire libre, con luz solar directa. En muchos casos, los indicios se encuentran en espacios exteriores, como en parques, caminos rurales, patios o vehículos estacionados a la intemperie. La exposición prolongada a la luz solar puede alterar la estructura química de la sangre y de sus componentes, dificultando su detección. La radiación UV contribuye especialmente a la degradación del ADN y de la hemoglobina, interfiriendo con los mecanismos de reactividad química.



Figura 7. Muestra de sangre expuesta a la luz solar en un espacio al aire libre.

- **Congelación a -20°C :** simula contextos donde los restos han sido conservados en ambientes fríos, ya sea de forma accidental o intencional. Este tipo de degradación podría encontrarse en zonas montañosas, viviendas sin calefacción en invierno, o cuerpos escondidos en congeladores o cámaras frigoríficas. Este tratamiento permite valorar si la congelación afecta a la integridad de la sangre o a la eficacia de los tests una vez descongelada.



Figura 8. Muestra de sangre para el estudio de congelación.

- **Exposición a alta temperatura (100°C):** representa una condición extrema que puede producirse en incendios, intentos de quemar el cuerpo en horno, chimenea u hoguera, o incluso en vehículos cerrados durante olas de calor. Las altas temperaturas pueden desnaturalizar proteínas y destruir glóbulos rojos, lo que reduce considerablemente la capacidad de los tests para detectar la sangre.

Tabla 2. Condiciones de simulación y tiempos de testeo del estudio.

Condición	Tiempo
Antigüedad	24 horas
	2 semanas
	4 meses*
	18 meses*
Exposición UV	24 horas
	1 semana
	2 semanas
Congelación	24 horas
	1 semana
	2 semanas
Exposición alta temperatura	30 minutos
	60 minutos
	90 minutos

*Las muestras para el estudio de antigüedad de 4 y 18 meses se encuentran en papel, a diferencia de todas las demás. El procedimiento a seguir es el mismo excepto la toma de muestra: se realiza un recorte del papel de aproximadamente 5 mm y se aboca al tubo de extracción.

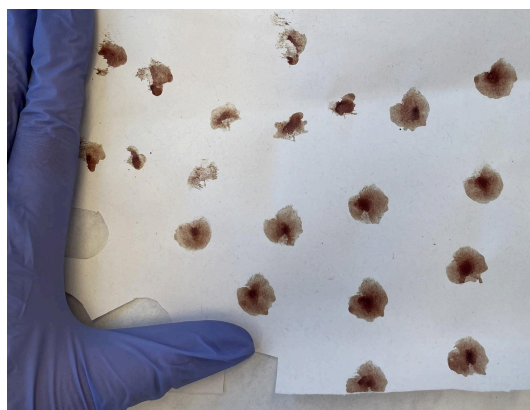


Figura 9. Muestras de sangre en papel de 4 meses de antigüedad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Control positivo y control negativo

Los resultados obtenidos en todos los controles positivos realizados han sido positivos, tanto para el test OBTI® Bluestar como para las tiras de urianálisis. Analizando la imagen adjunta en anexos, en las réplicas 2 y 3 se aprecia una pequeña tinción de la tira inmunocromatográfica debido a una alta concentración de hemoglobina. Por esta razón se volvieron a repetir estos controles con una concentración menor de sangre, dando también un resultado positivo.

Por otro lado, los controles negativos de ambos tests mostraron resultados negativos en todas las réplicas, lo que indica una buena especificidad en ausencia de interferencias.

4.2. Estudio de especificidad

Tabla 3. Resultados del estudio de especificidad.

Producto testado	Test OBTI	Tiras de uroanálisis
Jugo de patata	Negativo	Negativo
Lejía	Negativo	Negativo
Sangre limpiada con lejía	Negativo	Negativo
Mezcla de sangre y lejía	Positivo	Positivo
Oxígeno activo	Negativo	Negativo
Sangre limpiada con oxígeno activo	Negativo	Negativo

Los resultados recogidos en la Tabla 3 muestran que ambos métodos de detección dieron resultados negativos en la mayoría de las condiciones evaluadas, lo que indica una buena especificidad general frente a sustancias potencialmente interferentes. La única excepción fue la mezcla a partes iguales de sangre con lejía, donde ambos tests ofrecieron un resultado positivo, lo que sugiere una posible interferencia reactiva provocada por la combinación de hemoglobina con el agente oxidante presente en la lejía.

En el caso del jugo de patata, ambos tests mostraron resultados claramente negativos, lo cual es relevante si se tiene en cuenta que algunas fuentes documentan la presencia de peroxidasas en tejidos vegetales, que podrían inducir reacciones similares a las de la hemoglobina. Sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas, el jugo de patata

no generó ningún falso positivo, lo que refuerza la especificidad de ambos métodos frente a este tipo de matrices.

Por otro lado, ni la lejía sola ni la sangre limpiada con lejía generaron señales positivas en los tests. Este resultado puede atribuirse al efecto degradante y desnaturalizante del hipoclorito sódico sobre la hemoglobina, que probablemente haya eliminado o alterado de forma irreversible el epítipo o el grupo hemo necesario para que los reactivos del test actúen. En contraste, cuando la sangre se mezcla directamente con la lejía en partes iguales, se observó una reacción positiva en ambos casos, lo que podría deberse a una liberación inicial de hemoglobina libre o productos intermedios que aún conservan actividad peroxidasa o antigénica suficiente para ser detectados.

Finalmente, el análisis con oxígeno activo (percarbonato sódico) dio lugar a resultados negativos en todos los ensayos realizados, tanto con los tests OBTI como con las tiras reactivas. Esto indica que, bajo las condiciones estudiadas, este agente de limpieza no provocó falsos positivos ni interfirió con la reacción de los tests.

4.3. Estudio de sensibilidad

Tabla 4. Resultados del estudio de sensibilidad.

	Test OBTI®	Tiras de urianálisis
Sin dilución	Positivo	Positivo
Dilución 1:10	Positivo	Positivo
Dilución 1:100	Positivo	Positivo
Dilución 1:1.000	Positivo	Positivo
Dilución 1:10.000	Positivo	Positivo
Dilución 1:100.000	Positivo	Positivo (débil)
Dilución 1:1.000.000	Positivo	Negativo
Dilución 1:3.000.000	Positivo (débil)	Negativo

Los resultados del estudio de sensibilidad del Test OBTI® muestran que el límite de detección es de 15,5 ng/mL Hb. Aunque la señal es débil, el kit especifica que sigue siendo un resultado positivo. Por lo tanto, se corrobora el LOD especificado por el fabricante.

El límite de detección de las tiras para análisis de orina obtenido en este estudio es de $1,55 \times 10^3$ ng/mL Hb. Analizando los resultados vemos que la señal positiva empieza a disminuir el la dilución 1:100.000.

4.4. Simulaciones de posibles casos reales

4.4.1. Antigüedad a temperatura ambiente

Tabla 5. Resultados del estudio de antigüedad a temperatura ambiente.

Tiempo	Test OBTI	Tiras de uroanálisis
24h	Positivo	Positivo
2 semanas	Positivo	Positivo
4 meses	Positivo	Positivo
18 meses	Positivo	Positivo

4.4.2. Exposición a la luz solar (radiación UV)

Tabla 6. Resultados del estudio de exposición a la luz solar.

Tiempo	Test OBTI	Tiras de uroanálisis
24h	Positivo	Positivo
1 semana	Positivo	Positivo
2 semanas	Positivo	Positivo

4.4.3. Congelación a -20°C

Tabla 7. Resultados del estudio de congelación a -20°C.

Tiempo	Test OBTI	Tiras de uroanálisis
24h	Positivo	Positivo
1 semana	Positivo	Positivo
2 semanas	Positivo	Positivo

4.4.4. Exposición a alta temperatura (100°C)

Tabla 8. Resultados del estudio de exposición a alta temperatura.

Tiempo	Test OBTI	Tiras de uroanálisis
30 minutos	Positivo	Positivo
60 minutos	Positivo	Positivo
90 minutos	Positivo	Positivo

Todos los resultados de las diferentes condiciones y tiempos analizados en esta fase final del estudio han resultado positivos.

Se ha realizado un registro fotográfico de todos los resultados, excepto para el estudio del oxígeno activo por problemas técnicos en la realización de las fotografías. Todos ellos se encuentran en el apartado de anexos.

5. CONCLUSIONES

Una vez realizados los estudios y analizados todos los resultados se han podido extraer varias conclusiones.

- La especificidad de ambos tests es muy similar, dando resultados negativos en los estudios de los posibles falsos positivos. La limpieza de la sangre con lejía y oxígeno activo son eficaces para evitar la detección de sangre.
- La sensibilidad de ambos tests es alta, pero la del test OBTI® Bluestar es mucho mayor que la de las tiras de análisis de orina.
- El rendimiento de ambos tests frente a las condiciones de simulación de posibles casos reales ha sido favorable confirmando la robustez y fiabilidad de ambos tests. No obstante, debería realizarse un estudio más exhaustivo para confirmar estos resultados, aumentando los tiempos y las temperaturas de tratamiento para la degradación de la sangre.
- El uso de tiras reactivas en ámbito forense como sustitución de los tests de inmunocromatografía no es recomendable, debido a la no diferenciación entre sangre humana y no humana y su menor sensibilidad para la detección. Aunque se trata de una buena herramienta para pruebas orientativas o auxiliares en el trabajo de campo forense.

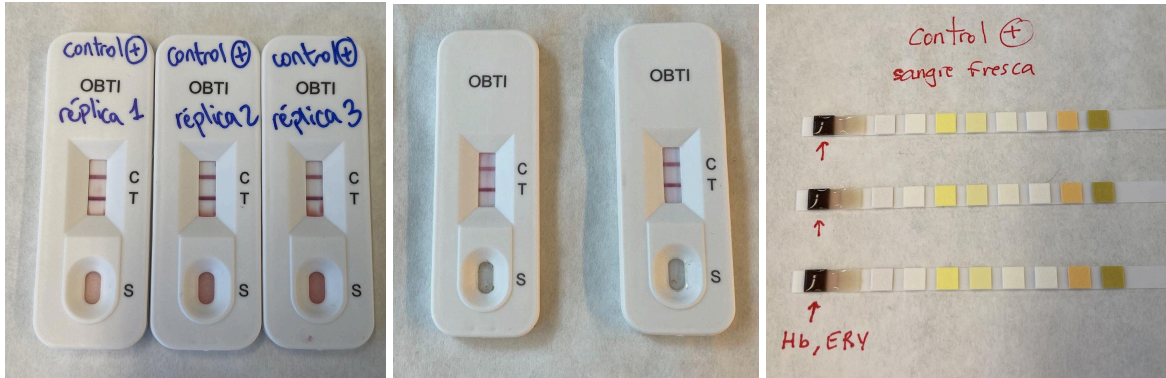
6. BIBLIOGRAFÍA

1. Quispe, S., & Flores, A. (2014). Detección de manchas de sangre mediante la prueba de luminol en la investigación forense. *Revista ConCiencia*, 2(1)
2. González Fuentes, L. R., y Domínguez Sanjur, K. A. (2024). Pruebas orientativas y confirmatorias para determinación de sangre humana. *Revista Cathedra*, (22), 76–83. <https://doi.org/10.37594/cathedra.n22.1532>
3. Hermon, D., Shpitzen, M., Oz, C., Glattstein, B., Azoury, M., & Gafny, R. (2003). The Use of the Hexagon OBTI Test for Detection of Human Blood at Crime Scenes and on Items of Evidence Part 1: Validation Studies and Implementation. *Journal of Forensic Identification*, 53(5), 566-575.
4. Solé Compte, J. (2021). *Detecció de sang mitjançant llum multiespectral*. Repositori URV. <https://hdl.handle.net/20.500.11797/TFM683>
5. Basset, P., Blandin, P., Grini, A., Delemont, S., Samie, L., & Castella, V. (2022). *A simplified protocol for the detection of blood, saliva, and semen from a single biological trace using immunochromatographic tests*. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 18(2), 141-148.
6. Cuttaia, C., Di Stefano, B., Sorçaburu Ciglieri, S., Vetrini, R., Previderè, C., & Fattorini, P. (2024). *Immunochromatographic detection of human blood: A forensic review*. *Separations*, 11(3), 66.
7. Jebur, Y. M. (2024). *The Evaluating the sensitivity of Hexagon OBTI test and Kastel-Meyer test by detection of human blood*. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 16(1), 78-81.
8. Castelló, A., Francés, F., & Verdú, F. (2011). *An alternative to the human hemoglobin test in the investigation of bloodstains treated with active oxygen: The human glycoporphin A test*. *The Scientific World JOURNAL*, 11(1), 907-916
9. Novelli, B. C. (2020). *A review of substances reported to cause false positives and negatives in forensic blood identification tests* (Master's thesis, Boston University).
10. https://www.bluestar-forensic.com/wp-content/uploads/2023/11/MODO_DE_EMPLEO_obti_ES_20200529.pdf
11. http://www.linear.es/ficheros/archivos/430_711100511parametersSpanish.pdf
12. Li R. *Forensic Biology*. 2nd ed. Taylor & Francis Group, 2015
13. Inoue, H.; Takabe, F.; Iwasa, M.; Maeno, Y. Identificación de la hemoglobina fetal y estimación simultánea de la edad de la mancha de sangre mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Int. J. Leg. Med.* 1991 , 104 , 127–131
14. von Heeren, F.; Thormann, W. Electroforesis capilar en análisis clínicos y forenses. *Electroforesis* 1997 , 18 , 2415–2426
15. Van Steendam, K.; De Ceuleneer, M.; Dhaenens, M.; Van Hoofstat, D.; Deforce, D. Proteómica basada en espectrometría de masas como herramienta para identificar matrices biológicas en ciencias forenses. *Int. J. Legal Med.* 2013 , 127 , 287–298

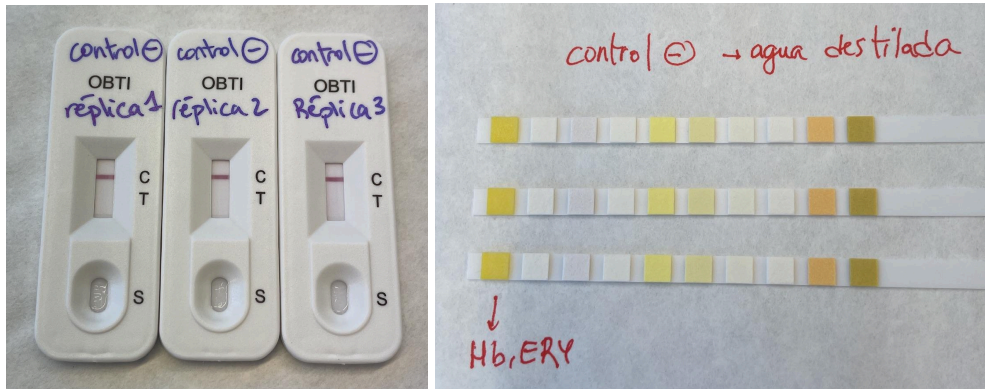
- 16.** Khandasammy, SR; Fikiet, MA; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halámková, L.; Bueno, J.; Lednev, I.K. Manchas de sangre, pinturas y drogas: Aplicaciones de la espectroscopia Raman en la ciencia forense. *Química Forense*. 2018 , 8 , 111–133
- 17.** Mistek-Morabito, E.; Lednev, I.K. Discriminación de trazas de sangre menstrual y periférica mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR FT-IR) y quimiometría con fines forenses. *Anal. Bioanal. Chem.* 2021 , 413 , 2513–2522
- 18.** Pereira, JFQ; Silva, CS; Vieira, MJL; Pimentel, MF; Braz, A.; Honorato, RS. Evaluación e identificación de manchas de sangre con espectrómetro NIR portátil. *Microchem. J.* 2017 , 133 , 561–566
- 19.** Sijen, T.; Harbison, SA. Sobre la identificación de fluidos y tejidos corporales: un eslabón crucial en la investigación y resolución de delitos. *Genes* 2021 , 12 , 1728

7. ANEXOS

- Controles positivos

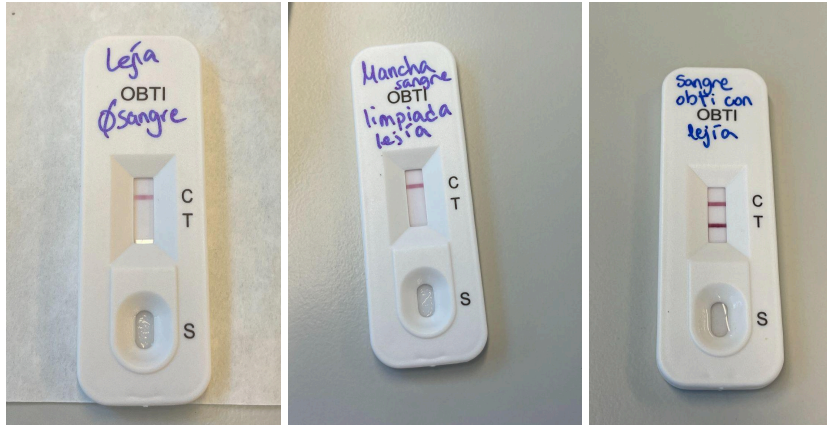


- Controles negativos

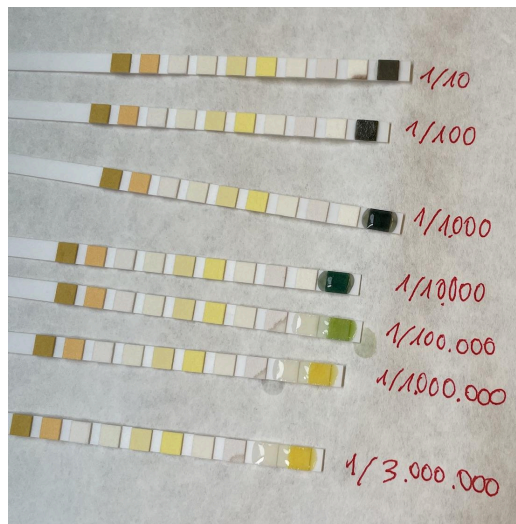


- Estudio de especificidad

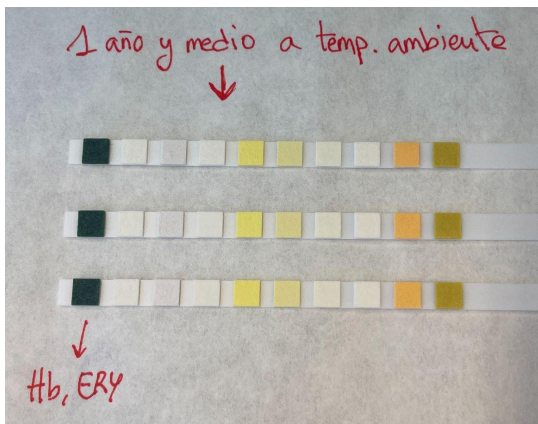
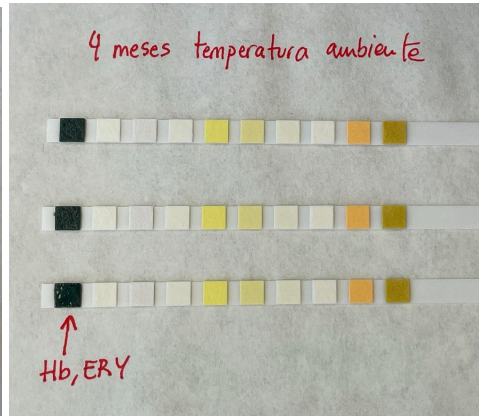
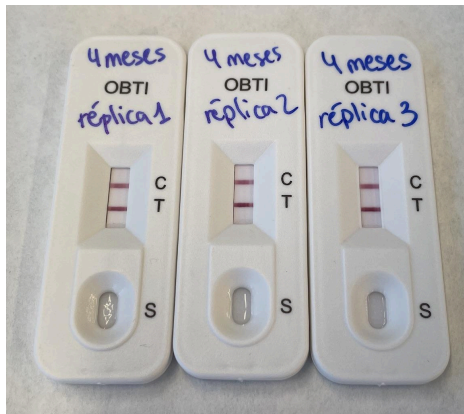
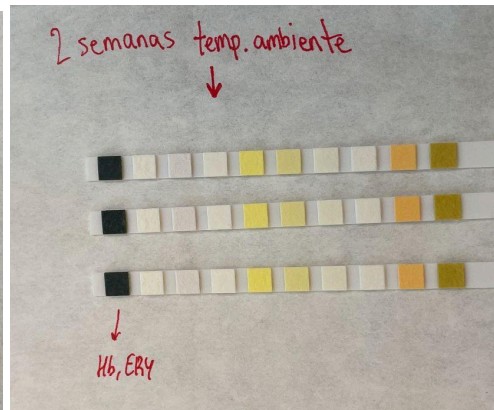
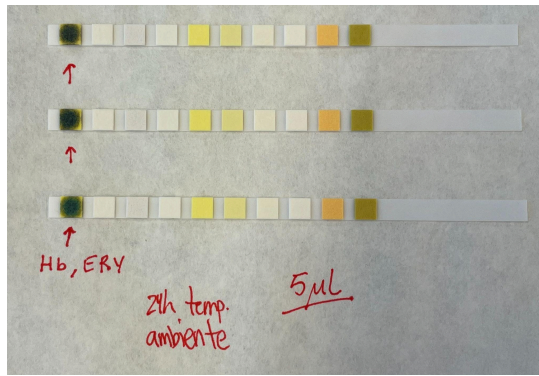




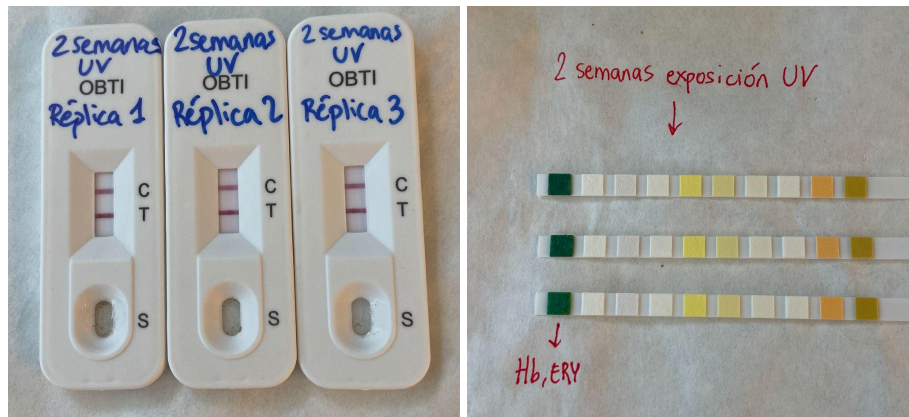
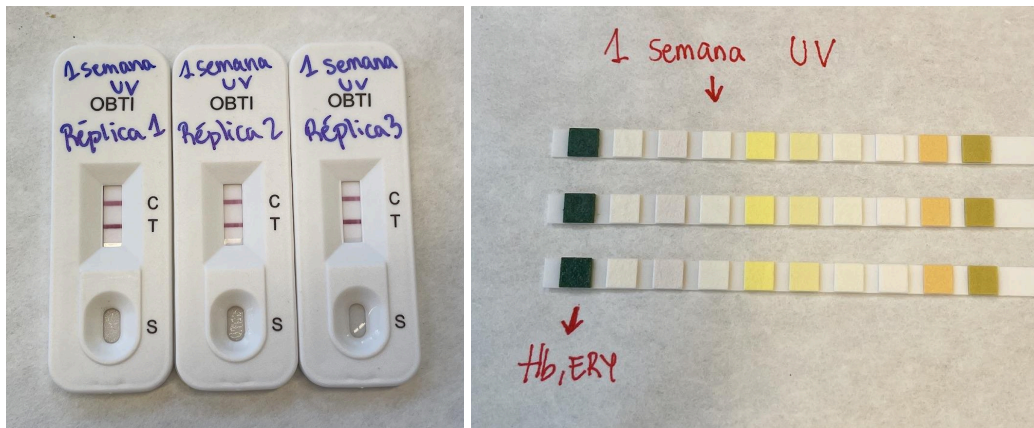
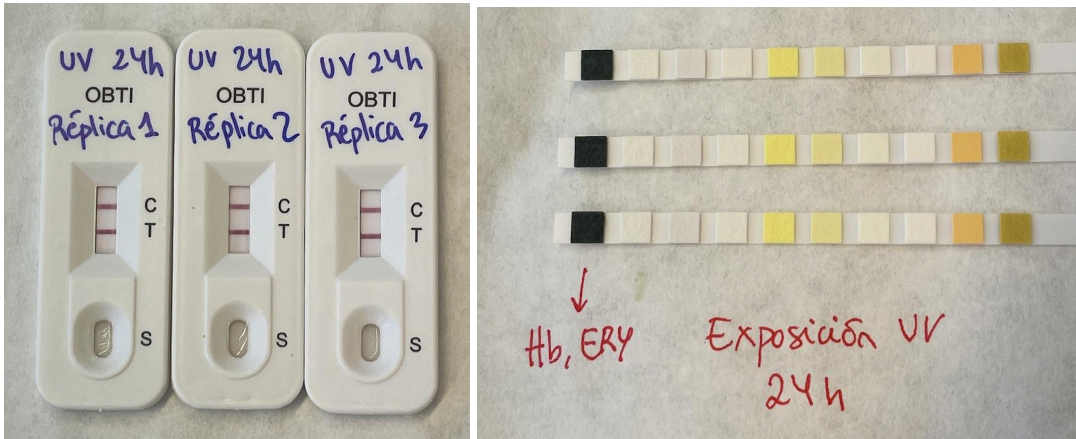
- Estudio de sensibilidad



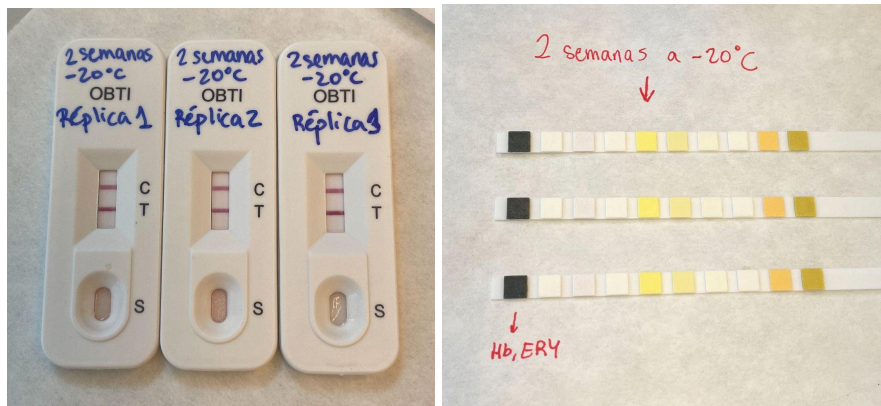
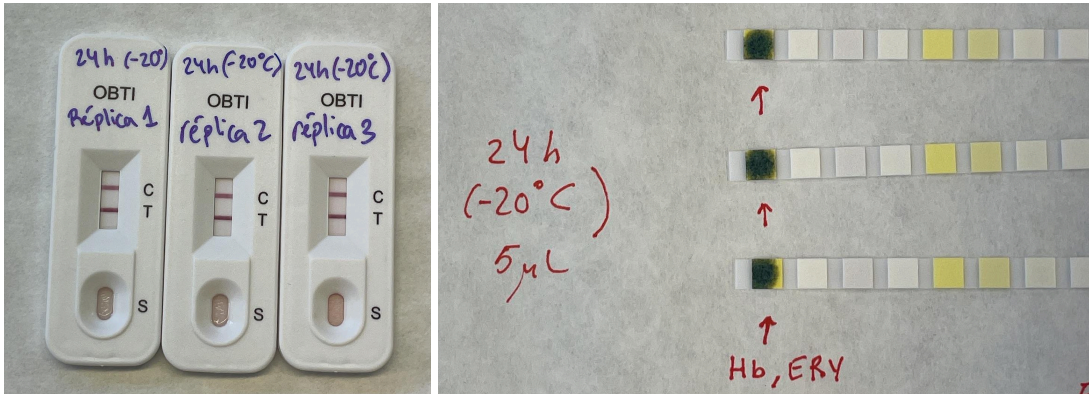
- Estudio de antigüedad a temperatura ambiente



- Estudio de exposición a la luz solar (radiación UV)



- Estudio de congelación a -20°C



- Estudio de exposición a alta temperatura (100°C)

