

Identificação e tipagem de sangue humano em amostras forenses por Enzima I

Maria Cristina Franck¹
Trícia Cristine Kommers Albuquerque²

Resumo

A identificação de sangue humano em amostras forenses é um pré-requisito importante aos exames de DNA que possibilitam o estabelecimento de relações entre indivíduos ou entre indivíduos e objetos envolvidos em infrações penais. Este trabalho teve como objetivo uma revisão bibliográfica dos métodos empregados para a confirmação de sangue humano, bem como, para a tipagem ABO e determinação de outros marcadores por ELISA (ensaio de imun absorção ligado à enzima) em amostras de importância forense. Métodos imunoenzimáticos são específicos, rápidos, sensíveis e permitem a automatização das análises, sendo, portanto, adequados à rotina de laboratórios forenses.

Palavras-chave: Sangue humano. ELISA. Amostras forenses.

Abstract

The human blood identification in forensic samples is an important prerequisite to the examination of DNA, enabling the establishment of relations between individuals or between individuals and objects involved in criminal offenses. This work aimed at a bibliographical review of methods used for confirmation of human blood, as well as ABO typing and determination of other markers by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in samples of forensic importance. Immunoenzymatic methods are specific, rapid, sensitive and allow the automation of analysis, being, therefore, suitable for the routine of forensic laboratories.

Keywords: Human blood. ELISA. Forensic samples.

1 Introdução

A detecção e confirmação de manchas de sangue de origem humana são de suma importância nas investigações forenses (HURLEY *et al.*, 2009). Manchas de sangue podem esclarecer a dinâmica dos fatos, indicando a posição, direção, distância e outros dados importantes relacionados ao delito (FORENSIC, 2010), bem como, estabelecer relações entre indivíduos ou entre indivíduos e objetos atra-

vés dos exames do ácido desoxirribonucleico (DNA) (CATTANEO *et al.*, 1992).

Os exames de DNA, de credibilidade inquestionável, apresentam a desvantagem do custo bastante elevado, o que gera a necessidade de realização de testes de triagem nas amostras com suspeita de ser sangue humano.

Na maioria dos casos, as amostras de sangue encontradas em locais de crime são ínfimas, secas e aderidas às mais diversas superfícies, requerendo

¹ Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil; especialista em Biologia e Genética Forense pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS; farmacêutica industrial pela UFRGS; perita químico-forense pelo Instituto-Geral de Perícias do RS (IGPRS), Porto Alegre, RS e professora da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo, RS. E-mail: maria-franck@igp.rs.gov.br

² Doutora e mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil; perita químico-forense pelo Instituto-Geral de Perícias do RS (IGPRS), Porto Alegre, RS e professora assistente do Centro Universitário La Salle, Canoas, RS. E-mail: tricia-albuquerque@igp.rs.gov.br

Artigo recebido em 01.05.2011 e aceito em 10.10.2011.

métodos sensíveis e específicos para a sua detecção (HURLEY *et al.*, 2009).

A identificação de sangue humano geralmente é feita por meio de testes presuntivos e confirmatórios (FLETCHER *et al.*, 1984; QUARINO; KOBILINSKY, 1988; HOCHMEISTER *et al.*, 1999).

Alguns dos testes presuntivos estão descritos na tabela 1.

O teste com luminol apresenta algumas desvantagens, tais como, necessidade de utilização de um catalisador, existência de interferências de fundo na emissão da luz, reação lenta e dependente do pH (FERREIRA; ROSSI, 2002).

Dentre os ensaios empregados para confirmar a presença de sangue, tem-se o teste de Takayama e o método espectrofotométrico, contudo, eles não especificam se a origem do sangue é humana (HOCHMEISTER *et al.*, 1999).

Para essa finalidade, são necessários testes

imunológicos (OEPEN, 1988; CATTANEO *et al.*, 1992; HOCHMEISTER *et al.*, 1999), tais como, o Hexagon OBTI^o e o kit ABACard^o HemaTrace^o. Esses ensaios são imunocromatográficos e detectam a presença de sangue humano pela formação de um complexo entre um anticorpo monoclonal (anti-hemoglobina humana), a amostra (antígeno) e um segundo anticorpo policlonal. As limitações desses testes incluem a possibilidade do efeito “gancho” (resultados falso-negativos, quando há grande quantidade de antígeno na amostra em relação aos anticorpos) e o custo, pois cada cartão permite a análise de apenas uma amostra (JOHNSTON *et al.*, 2008; HURLEY *et al.*, 2009).

Uma metodologia sensível, específica e prática que pode ser empregada como alternativa na confirmação de várias amostras de sangue humano simultaneamente é o ensaio imunoenzimático ou ensaio de imunoabsorção ligada à enzima (ELISA).

Tabela 1 - Características de alguns testes utilizados para detecção preliminar de sangue

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Dano ao DNA
Luminol	Sensível	Específico	Não
Verde de leucomalaquita	Pouco sensível	Específico	Sim
Fenoltaleína	Não especificada	Pouco específica	Parcial
Hemastix [®]	Sensível	Pouco específico	Não
Hemident [®]	Sensível	Muito específico	Sim
Bluestar [®]	Sensível	Pouco específico	Não determinado
Fluoresceína	Sensível	Não especificada	Não

Fonte: Budowle *et al.*, (2000); Tobe *et al.*, (2007); Johnston *et al.*, (2008).

2 Metodologia ELISA

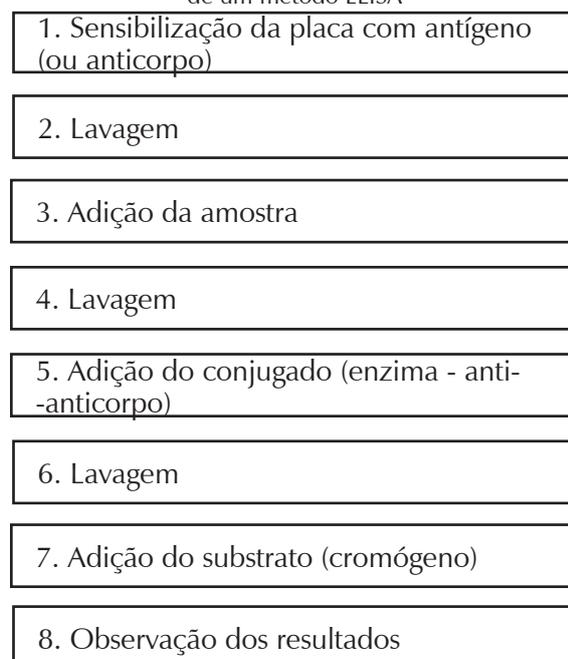
ELISA é um método imunoenzimático baseado na forte capacidade de ligação não covalente que os anticorpos apresentam em relação ao seu alvo, mesmo na presença de outros materiais, ou seja, possui grande especificidade e sensibilidade (WILD, 2005).

O primeiro relato de utilização dessa técnica foi feito por Engvall e Perlmann em 1971 para quantificação de antígenos em medicina forense (TOKIWA *et al.*, 1990).

A execução desse teste é simples, conforme descrito no esquema 1.

Inicialmente, há a sensibilização da placa com o antígeno ou anticorpo. Essa placa, que também pode ser chamada de cubeta, microplaca ou poço, é a fase sólida do sistema e pode ser composta por agarose, poli(acrilamida), poliestireno, membrana porosa de acetato de celulose ou papel de nitrocelulose. O excesso dos reagentes é descartado por etapas de lavagem. Adiciona-se albumina sérica bovina, para bloquear as ligações não específicas e, em seguida, adiciona-se a amostra a ser testada

Esquema 1 - Resumo das etapas de execução de um método ELISA



Fonte: Roitt *et al.*, (1998).

e o conjugado Enzima – Anti-Anticorpo (específico para outra região da molécula), formando um complexo Antígeno – Anticorpo (amostra) – Conjugado (LAPPAS; FREDENBURG, 1981; KASHYAP, 1989; ZHOU *et al.*, 1990; HENRY, 1995; ROITT *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 1999).

Devido ao estabelecimento de uma dupla camada de anticorpos, esse ensaio também é chamado de ELISA sanduíche.

Logo após, há a adição de um substrato que ativa a enzima ligada e produz uma coloração cuja intensidade pode ser medida por densidade óptica (ROITT *et al.*, 1998). Cada molécula de enzima pode ligar-se a muitas moléculas de substrato, o que favorece a sensibilidade do teste (KUBY, 2002; WILD, 2005).

A interpretação dos resultados pode ser feita de forma visual ou com auxílio de instrumentos de medida de absorbância. Atualmente, as leitoras de microplacas possuem elevados graus de automação, realizando as leituras com alta precisão e em poucos segundos (ROITT *et al.*, 1998).

3 Pesquisa de sangue humano

Os métodos empregados para identificar a origem de amostras forenses de sangue baseiam-se na presença de proteínas séricas humanas (TOKIWA *et al.*, 1990), tais como, albumina, hemoglobina ou imunoglobulinas (IgG, b-tromboglobulina) (CATTANEO *et al.*, 1992; FILHO, 1996; HURLEY *et al.*, 2009).

Dentre os testes descritos para essa finalidade, destacam-se: o teste da precipitina, hemaglutinação, aglutinação em látex, microespectrométrico, porfirina, peroxidase, teste do anel de Ascoli, teste de fixação do complemento, teste de imunodifusão, eletroforese cruzada, imunoeletroforese, teste de inibição da globulina anti-humana, microprecipitação, imunoeletrosinereze, focalização isoeletrica, imunoensaio em microcamada e radioimunoensaio (TAMAKI; KISHIDA, 1983; IKEMOTO *et al.*, 1984; TOKIWA, 1986; YUKAWA *et al.*, 1987; OEPEN, 1988; TAJIMA *et al.*, 1988; FÖRSTER; BRUDER, 1990; SATO *et al.*, 1990; CATTANEO *et al.*, 1992; HURLEY *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Métodos de identificação de sangue humano por ELISA.

Anticorpos	Enzima	Substrato / Leitura	Referência
IgG anti-humana / albumina sérica anti-humana / hemoglobina anti-humana	IgG conjugada à peroxidase <i>horseradish</i>	H ₂ O ₂ – orto-fenilenodiamina / 492 nm	TAMAKI; KISHIDA, 1983
Anticorpo monoclonal C ₄ (cadeia lambda)	IgG conjugada à fosfatase alcalina	p-nitrofenil fosfato – MgCl ₂ / 405 nm	FLETCHER <i>et al.</i> , 1984
IgG e Hb A anti-humana	Peroxidase <i>horseradish</i>	Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico / Fluorescência	YUKAWA <i>et al.</i> , 1987
Haptoglobina anti-humana	-	H ₂ O ₂ – orto-fenilenodiamina / Visual	KASHYAP, 1989
IgG humano. Anticorpo primário: IgG monoclonal anti-humana Anticorpo secundário: IgG	Complexo avidina-biotina-peroxidase	H ₂ O ₂ – orto-fenilenodiamina / 492 nm	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1989
IgG anti HbAo humana ligada à biotina	Complexo avidina-biotina peroxidase / fosfatase alcalina	H ₂ O ₂ – orto-fenilenodiamina / 492 nm e Dietanolamina – p-nitrofenil fosfato – MgCl ₂ – NaN ₃ / 405 nm	TOKIWA <i>et al.</i> , 1990
Anticorpos monoclonais albumina e IgG anti-humanas / IgG ligada à biotina.	Streptavidina peroxidase	H ₂ O ₂ – 5-amino ácido salicílico / Visual	CATTANEO <i>et al.</i> , 1992
Anticorpo IgG anti-humano	Peroxidase <i>horseradish</i>	4-cloro-1-naftol / 450 nm	HURLEY <i>et al.</i> , 2009

Fonte: As autoras, (2011).

É possível também fazer a diferenciação de amostras de sangue de diferentes espécies por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) pela separação das cadeias de globina (INOUE *et al.*, 1990; ANDRASKO; ROSÉN, 1994), porém essa técnica exige um equipamento de custo elevado sendo, portanto, de acesso restrito aos laboratórios forenses.

Apesar dessa diversidade de métodos destinados à pesquisa de sangue humano, essas técnicas são demoradas e requerem alta habilidade dos analistas (FLETCHER *et al.*, 1984; KASHYAP, 1989).

Uma alternativa viável para a caracterização das amostras de sangue é o ensaio ELISA. A tabela 2 apresenta um resumo dos métodos descritos na literatura para a identificação de sangue humano por esse imunoensaio.

4 Tipagem sanguínea - ABO

A determinação do tipo sanguíneo pelo sistema ABO pode ser feita após a confirmação da

presença de sangue humano em uma determinada amostra. Apesar dessa informação não ser determinante para a elucidação do caso, ela representa uma ferramenta muito importante na triagem das amostras para exames de DNA.

O exame de sangue pelo sistema ABO foi utilizado pela primeira vez no Brasil em 1927 como prova em investigação de paternidade forense em São Paulo (FILHO, 1996).

Pelos métodos convencionais, para se determinar a tipagem sanguínea é necessária uma amostra adequada e de boa qualidade (FORENSIC, 2010). A tipagem de manchas secas de sangue é difícil, demorada, requer certa habilidade e muita experiência para avaliar os resultados. Além disso, podem ocorrer sérias alterações na composição sanguínea ao longo do tempo, conforme as condições ambientais, como temperatura, características da superfície de contato, estado de putrefação, umidade e luminosidade (MITULLO, 1966; EL-HABASHI *et al.*, 1991).

Tabela 3 - Métodos de determinação do tipo sanguíneo ABO por ELISA.

Anticorpos	Enzima	Substrato / Leitura	Referência
Soro anti-B humano / IgG anti-A / IgM monoclonal anti-A e anti-B / IgG	IgG conjugada à peroxidase	H ₂ O ₂ - o-dianisidina / 405 nm	AOKI <i>et al.</i> , 1987
Anticorpos monoclonais anti-A, anti-B e anti-glicoconjugado	Conjugado fosfatase alcalina anti-rato	Dietanolamina - p-nitrofenil fosfato - MgCl ₂ - NaN ₃ / filtro de referência 630 nm e filtro teste 410 nm	FLETCHER; STEPHENS, 1987
Anticorpos de captura policlonais / Anticorpos de detecção IgG monoclonais anti-A, anti-B, anti-H, anti-Le ^a e anti-Le ^b	IgM conjugada à fosfatase alcalina	Dietanolamina - p-nitrofenil fosfato - MgCl ₂ - Na ₂ N ₃ / 410 nm	SAGISAKA <i>et al.</i> , 1989
Anticorpos policlonais humanos anti-A e anti-B e anti-M e anti-N / Anticorpos monoclonais anti-M e anti-N / IgG anti-humano / IgM	Peroxidase horseradish avidina	H ₂ O ₂ - orto-fenilenodiamina / 492 nm	SODESAKI, 1990
Anticorpos policlonais humanos anti-A, soro B e monoclonais anti-A	IgG conjugada à fosfatase alcalina	p-nitrofenol fosfato	AOKI <i>et al.</i> , 1992
Anticorpo anti-A, anti-B ou lectina H específica	Peroxidase conjugado lectina <i>Ulex europaeus</i> I	H ₂ O ₂ - orto-fenilenodiamina / 490 nm	MATSUBARA <i>et al.</i> , 1996

Fonte: As autoras, (2011).

Com o advento da tecnologia dos anticorpos monoclonais, altamente sensíveis e específicos aos antígenos do sistema ABO presentes no sangue e em outras matrizes biológicas (FLETCHER; STEPHENS, 1987; KOBAYASHI *et al.*, 1999), o anticorpo com a enzima-marcada pode ser simultaneamente incubado com o anticorpo imobilizado na fase sólida (FLETCHER *et al.*, 1984; IKEMOTO *et al.*, 1984; YAMAMOTO *et al.*, 1989; CATTANEO *et al.*, 1992; HENRY, 1995).

A identificação e tipagem ABO de manchas de sangue por ELISA apresenta um limite de detecção duzentas vezes maior que o obtido pelos testes de verde de leucomalaquita e de precipitação em anel, usando soro anti-humano HbA (SAITO; TOKIWA, 1992).

A tabela 3 apresenta um resumo dos métodos descritos na literatura para a tipagem ABO de amostras de sangue por ELISA.

5 Outros marcadores

Ainda, na etapa de triagem de amostras aos exames de DNA, pode-se determinar em manchas de sangue outros marcadores que apresentam importância forense. Os marcadores mais comuns são ABH, MN, Rh, Gm e Km, pois em pequenas quantidades de amostra podem ser detectados, após longos períodos de tempo (OEPEN, 1988; FORENSIC, 2010).

No soro existem substâncias que se transmitem hereditariamente que são os grupos séricos Gm, Gc e Hp, sendo que há três indicadores para o sistema gamaglobulina: Gm(a), Gm(b) e Gm(x). Esse sistema é empregado com grande eficiência na investigação criminal, pois pode ser verificado em manchas secas de sangue (FILHO, 1996).

A determinação do tipo Rh em conjunto ao sistema ABO permite uma avaliação da frequência na população, auxiliando no trabalho pericial, conforme descrito na tabela 4.

A tabela 5 apresenta alguns métodos descritos na literatura para a identificação de outros marcadores sanguíneos por ELISA.

Em se tratando ainda de células vermelhas do sangue, existem os sistemas enzimáticos eritrocitários, detectáveis por eletroforese como, por exemplo, a fosfatase ácida, fosfoglicomutase, glutamato piruvato transaminase e a glicoxalase (FILHO, 1996). Essas proteínas e enzimas são polimorfismos (iso-enzimas), ou seja, existem sob várias formas e variantes, onde cada uma tem seus subtipos (FORENSIC, 2010). Os polimorfismos mais comuns estão descritos na tabela 6.

Tabela 4 - Probabilidade de distribuição do componente Rh

Tipo sanguíneo	1 em cada
O+	3 pessoas
O-	15 pessoas
A+	3 pessoas
A-	16 pessoas
B+	12 pessoas
B-	67 pessoas
AB+	29 pessoas
AB-	167 pessoas

Fonte: Forensic, (2009; 2010).

Tabela 5 - Métodos de identificação de marcadores sanguíneos por ELISA

Marcadores	Referências
ABH	RUKAVISHNIKOVA, 1985; SAGISAKA, 1989; AOKI, 1992; MATSUBARA, 1996
Haptoglobina	KASHYAP, 1989
Anti-A, anti-B, anti-M e anti-N policlonais	SODESAKI, 1990
Anti-M e anti-N monoclonais	
MN	BAO <i>et al.</i> , 2000

Fonte: As autoras, (2011).

Tabela 6 - Polimorfismos enzimáticos sanguíneos mais comuns

Sigla	Descrição	Deteção
PGM 2-1	Fosfoglicomutase	2 - 3 meses
EAP	Fosfatase ácida do eritrócito	5 - 43 meses
EsD	Esterase D	2 - 10 semanas
AK	Adenilquinase	Mais de 6 meses
ADA	Adenosina deaminase	1 - 2 meses
GPT	Glutamato piruvato transaminase	-
Tf	Transferrina	2 semanas - 6 meses
G-6-PD	Glicose 6 fosfato desidrogenase	-

Oepen, (1988); Winchester, (1993); Forensic, (2010).

Cada variante proteica e enzimática, bem como os tipos sanguíneos, tem sua distribuição conhecida na população. Por exemplo, se uma amostra apresentar o tipo A (42%), subtipo A2 (25%), proteína AK (15%) e enzima PGM2 (6%), a probabilidade

de se encontrar duas pessoas em uma população com exatamente essa configuração seria menor que 0,000945 (0,42x0,25x0,15x0,06) (FORENSIC, 2010).

6 Discussão

Métodos adequados de triagem são de extrema importância, pois permitem que apenas as amostras confirmadas para presença de sangue humano e que apresentem características compatíveis possam ser encaminhadas aos exames de DNA, permitindo a otimização das rotinas e a redução dos custos, favorecendo a eficiência dos serviços prestados por laboratórios forenses.

Muitos métodos de identificação de sangue humano por ELISA são descritos na literatura, porém, a sensibilidade, especificidade, precisão e reprodutibilidade variam conforme o tipo de fase sólida, do anticorpo empregado, do conjugado enzima-anticorpo, da enzima, do método de leitura, da natureza e da extensão da reação antígeno-anticorpo (HENRY, 1995). Cada laboratório deve desenvolver o seu método de análise, avaliar o grau de interferência das suas condições analíticas de acordo com o nível de exigência considerado seguro e adequado às suas peculiaridades e demanda.

Além disso, os métodos encontrados na literatura indicam a possibilidade de reatividade cruzada com amostras provenientes de outras espécies animais. O perito deve avaliar o grau de importância dessa interferência analítica no contexto individual de cada caso.

Uma variável citada nos métodos descritos é a concentração da amostra, pois, quando há um excesso de proteínas, pode ocorrer uma redução do número de sítios específicos acessíveis ao segundo anticorpo, levando a resultados incorretos (FLETCHER *et al.*, 1984; HENRY, 1995). Esse fator também deve ser considerado na padronização da metodologia escolhida pelo laboratório, pois possibilita o conhecimento dos limites de detecção e de confiabilidade da técnica empregada.

As amostras forenses são, geralmente, coletadas nas mais diversas superfícies que, muitas vezes, ficaram expostas às condições ambientais. Essa característica deve ser levada em conta na avaliação dos resultados da tipagem sanguínea pelo sistema ABO, pois existe a possibilidade de ocorrência de antígenos A ou B adquiridos pela estocagem de amostras de sangue contaminadas por bactérias, como relatado por Schwerd e Noll (1984).

Outras situações também devem ser avaliadas, tais como, os antígenos A e B que, normalmente

são herdados através de dois alelos diferentes, raramente são herdados em bloco, chamado de "cis-AB". Essa variante gera uma situação, onde a mãe apresenta o tipo O e a criança AB. Ainda, pode ocorrer quimerismo, situação, onde há dois tipos sanguíneos diferentes na mesma pessoa (3/5 do seu sangue é do tipo O e o restante do tipo A, por exemplo) (FILHO, 1996).

Essas considerações demonstram a complexidade da estrutura gênica dos indivíduos e a importância de se conhecer as limitações dos métodos utilizados na ciência forense.

7 Conclusão

Muitos são os recursos utilizados na área forense com o intuito de analisar vestígios de origem biológica, pois essas amostras permitem tanto a comprovação do envolvimento de um determinado indivíduo como também a possibilidade de exclusão de alguns suspeitos de um local de crime.

O sangue é a mais comum e importante evidência da justiça criminal. Testes preliminares ao exame de DNA evitam o desperdício de tempo e de materiais em amostras não biológicas que podem confundir-se a manchas de sangue.

O levantamento bibliográfico realizado a respeito do método ELISA permite concluir que é possível a sua aplicação na rotina forense como método de triagem e também para a avaliação de vários marcadores sorológicos, o que pode dispensar, em alguns casos, a própria necessidade dos exames de DNA.

A metodologia ELISA é uma técnica simples, rápida, de baixo custo, sensível, específica e reprodutível, satisfazendo os requisitos necessários aos métodos analíticos, sendo, portanto, uma alternativa viável para detecção de sangue humano na ciência forense.

Referências

ANDRASKO, J.; ROSÉN, B. Sensitive identification of hemoglobin in bloodstains from different species by high performance liquid chromatography with combined UV and fluorescence detection. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 39, n. 4, p. 1018-1025, 1994.

AOKI, Y.; FUNAYAMA, M.; SAGISAKA, K. Detection of AB antigen in blood stain using enzyme-linked immunosorbent assay. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v. 152, n. 3, p. 277-281, 1987.

- AOKI, Y. *et al.* Blood grouping of minute samples using monoclonal anti-A, B antibody. **Japanese Society of Legal Medicine**, Tokyo, v. 46, n. 6, p. 436-439, 1992.
- BAO, L. *et al.* The MN typing of whole blood and bloodstains by the method of one-step sandwich ELISA. **Fa Yi Xue Za Zhi**, Shang-Hai, v. 16, n. 3, p. 146-147, 2000.
- BUDOWLE, B. *et al.* The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 45, n. 5, p. 1090-1092, 2000.
- CATTANEO, C. *et al.* Detection of human proteins in buried blood using ELISA and monoclonal antibodies: Towards the reliable species identification of blood stains on buried material. **Forensic Science International**, Turku, v. 57, n.2, p. 139-146, 1992.
- EL-HABASHI, A. A. *et al.* Study on the factors affecting ABO grouping of blood stains. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v. 21, n. 1, p. 151-161, 1991.
- FERREIRA, E. C.; ROSSI, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1003-1011, 2002.
- FILHO, F. S. **A Prova na Investigação de Paternidade**. 5. ed. Curitiba: Juruá Editora, 1996.
- FLETCHER, S. M.; DOLTON, P.; SMITH, P. W. H. Species identification of blood and saliva stains by enzyme-linked immunoassay (ELISA) using monoclonal antibody. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 29, n. 1, p. 67-74, 1984.
- FLETCHER, S. M.; STEPHENS, D. M. An evaluation of anti-A and anti-B monoclonal antibodies for ELISA grouping of blood and body fluid stains. **Revue Francaise de Transfusion et Immunohematologie**, Paris, v. 30, n. 5, p. 421-428, 1987.
- FORENSIC Serology. Blood is thicker than water, 2008. Disponível em: <<http://www.apsu.edu/oconnort/3210/3210lect06>>. Acesso em: 02 dez. 2009.
- FORENSIC Serology. Blood typing, 2003. Disponível em: <<http://faculty.ncwc.edu/mstevens/425/lecture13>>. Acesso em: 13 jan. 2010.
- FÖRSTER, R.; BRUDER, W. Sensitivity of various study technics in blood stains. **Archiv für Kriminologie**, Freiburg, v. 185, n. 5-6, p. 150-162, 1990.
- HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos & Tratamento por métodos laboratoriais**. Tradução de: Nelson Gomes de Oliveira, *et al.* 18 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995.
- HOCHMEISTER, M. N. *et al.* Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 44, n. 3, p. 597- 602, 1999.
- HURLEY, I. P. *et al.* Detection of human blood by immunoassay for applications in forensic analysis. **Forensic Science International**, Turku, v. 190, p. 91-97, 2009.
- IKEMOTO, S. *et al.* Application of monoclonal anti-A and anti-B antibodies to the blood grouping of blood stains. **Japanese Society of Legal Medicine**, Tokyo, v. 38, n. 3, p. 302-305, 1984.
- INOUE, H. *et al.* Species identification of blood and bloodstains by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 104, n. 1, p. 9-12, 1990.
- JOHNSTON, E. *et al.* Comparison of presumptive blood test kits including Hexagon OBTI. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 53, n. 3, p. 687-689, 2008.
- KASHYAP, V. K. A simple immunosorbent assay for detection of human blood. **Journal of Immunoassay**, New York, v. 10, n. 4, p. 315-324, 1989.
- KOBAYASHI, T. *et al.* Effects of solvent displacement on sensitivity and specificity of monoclonal antibodies for ABO blood grouping of forensic specimens with an absorption-elution test. **Legal Medicine**, Fukuoka, v. 1, n. 2, p. 68-75, 1999.
- KUBY, J. **Immunology**. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.
- LAPPAS, N. T.; FREDENBURG, M. E. The identification

- of human bloodstains by means of a micro-thin-layer immunoassay procedure. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 26, n. 3, p. 564-569, 1981.
- MATSUBARA, K. *et al.* A unique and sensitive ELISA Technique for typing ABH antigens in bloodstains using UEA-I Lectin – The removal of detergent with a Sephadex G-25 mini-column improves sensitivity. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 41, n. 1, p. 35-39, 1996.
- OEPEN, I. Identification of characteristics in blood and semen stains – a review. **Forensic Science International**, Turku, v. 36, p. 183-191, 1988.
- QUARINO, L.; KOBILINSKY, L. Development of a radioimmunoassay technique for the detection of human hemoglobin in dried bloodstains. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 33, n. 6, p. 1369-1378, 1988.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5. ed. London: Mosby, 1998.
- RUKAVISHNIKOVA, G.E.; POTAPOV, M.I.; SIGAL, E.R. Detection of soluble antigens of blood group ABH using immunoenzyme analysis. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii**, Moskva, v. 1, p. 69-73, 1985.
- SAGISAKA, K. *et al.* Specific capture of ABH blood group antigens of the red cell or body fluids by double antibody sandwich-ELISA. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v. 158, n. 3, p. 211-219, 1989.
- SAITO, S.; TOKIWA, K. Sensitive identification of human blood and simultaneous determination of ABO blood group from a minute bloodstain by an ELISA-ABC method. **Nihon Hoigaku Zasshi**, Tokyo, v. 46, n. 6, p. 483-491, 1992.
- SATO, M.; HIGASHIDE, K.; KATSUMATA, Y. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used to differentiate type AB specimen from a mixture of type A and type B specimens. **Forensic Science International**, Turku, v. 46, p. 231-242, 1990.
- SCHWERD, W.; NOLL, A. Dependability of ABO findings in stored blood samples. **Zeitschrift für Rechtsmedizin**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 111-116, 1984.
- SODESAKI, K. A cell surface ELISA for detection of blood group antibodies on anti-ABO and –MN blood group antibodies. **Japanese Society of Legal Medicine**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 109-114, 1990.
- TAJIMA, M.; TOKIWA, K.; KATSURA, S. Comparative studies between counterimmunoelectrophoresis and microprecipitation method of identification of human minute bloodstains. **Zeitschrift für Rechtsmedizin**, Berlin, v. 99, n. 4, p. 227-233, 1988.
- TAMAKI, Y.; KISHIDA, T. Identification of human bloodstains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Japanese Society of Legal Medicine**, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 84-87, 1983.
- TOBE, S.S.; WATSON, N.; DAEID, N.N. Evaluation of six presumptive tests for blood their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 52, n. 1, p. 102-109, 2007.
- TOKIWA, K. A sequence of tests of minute human blood stains for human origin identification and ABO blood grouping. **Zeitschrift für Rechtsmedizin**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 157-164, 1986.
- TOKIWA, K. *et al.* Rapid and sensitive identification of human blood by an ELISA-ABC method using a biotinylated antibody against human HbAo. **Zeitschrift für Rechtsmedizin**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 329-334, 1990.
- VITULLO, L. R. Use of enzyme-treated cells in grouping dried bloodstains. **The Journal of Criminal Law, Criminology and Police Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 356-359, 1966.
- WILD, D. (Ed.). **The Immunoassay Handbook**. 3 ed. San Diego: Elsevier, 2005.
- WINCHESTER, R. V. ABO, phosphoglucosylase and erythrocyte acid phosphatase typing of blood samples containing added fluoride. **Journal Forensic Science Society**, Harrogate, v. 33, n. 3, p. 159-164, 1993.
- YAMAMOTO, Y.; TSUTSUMI, A.; ISHIZU, H. Species identification of blood and bloodstains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-human immunoglobulin kappa light chain monoclonal antibody. **Forensic Science International**, Turku, v. 40, n. 1, p. 85-95, 1989.
- YUKAWA, N. *et al.* A highly specific and sensitive

sandwich enzyme immunoassay for human hemoglobin A. **Forensic Science International**, Turku, v. 35, n. 4, p. 253-265, 1987.

ZHOU, B. *et al.* The rapid determination of the

ABO group from body fluids (or stains) by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) using enzyme-labeled monoclonal antibodies. **Journal of Forensic Sciences**, The Woodlands, v. 35, n. 5, p. 1125-1132, 1990.