

*Alexandre Beaudoin, Agt Claude Harrison and Christian Brown
Service de l'Identité Judiciaire, Sûreté du Québec, Québec.*

Introduction

Il arrive fréquemment sur une scène de crime de devoir utiliser le test présomptif du luminol pour découvrir des traces potentielles de sang. En tant que test présomptif, le luminol est, par contre, susceptible de produire des faux positifs. Il devient donc important de déterminer s'il s'agit effectivement de sang. Dans la positive, la détermination de l'origine humaine ou non du sang devient impérative pour le séquençage d'ADN.

Présentement, la Sûreté du Québec utilise un deuxième test présomptif, appeler Hémasstix, pour avoir une forte indication de présence de sang. L'hémasstix est sensible à l'hémoglobine du sang avec une concentration minimale de 150 à 620 µg/L [1]. Malencontreusement, ce test ne permet pas de déterminer s'il s'agit de sang humain. Pire encore, il a également la fâcheuse habitude de donner des faux positifs avec les hypochlorites et la peroxydase. Jusqu'à tout récemment, l'hémasstix consistait en le seul test présomptif reconnu par la Sûreté du Québec et la GRC¹ afin de diminuer la quantité de faux positifs suite à l'application du luminol sur une scène de crime.

La littérature a dernièrement discuté d'un nouveau produit prometteur qui est, depuis peu, disponible au Canada. Il s'agit du Hexagon OBTI test ; un test immunochromatographique rapide de détection du sang humain. Ce nouveau produit spécifique à l'hémoglobine de primate s'est avéré très performant et valable pour l'identification judiciaire du sang humain dans plusieurs études [2-4]. Le test en soi est très simple d'utilisation et peut être effectué directement sur la scène de crime sans autres artifices [5].

Introduction

The use of the presumptive test luminol to detect possible bloodstains is often required at a crime scene. Because the test is only presumptive, luminol may produce false positives. It is thus very important to determine if a stain is really blood, and, if it is, to determine if it is human in origin, prior to DNA typing.

Currently, the Sûreté du Québec uses a second presumptive test, Hemastix, to get a stronger indication of the presence of blood. Hemastix react with the hemoglobin in blood with a minimum concentration of 150 to 620 µg/L [1]. Unfortunately, this test does not determine if the blood is human, and it also has the drawback of giving false positives with hypochlorites and peroxidase. Until recently, Hemastix was the only presumptive test recognized by the Sûreté du Québec and the Royal Canadian Mounted Police (RCMP)¹ for reducing the number of false positives detected by luminol at a crime scene.

Recently, a promising new product, only recently available in Canada, has been described in the literature. The Hexagon OBTI test is a rapid immunochromatographic test for human blood. This new product, which reacts specifically with primate hemoglobin, has been shown in many previous studies to be a very successful and valid forensic test for human blood [2-4]. The test itself is very simple to use and can be carried out directly at the crime scene [5].

At present, the OBTI test is not used by the RCMP forensic laboratories to determine if blood is of human or animal origin. This study was carried out in an attempt to validate the efficiency of this test, and to eventually incorporate it into the material

¹ Méthode enseignée par la GRC en 2002 par J.A.S. Laroque Sgt. FFS, CSA

¹ Method taught in 2002 by Sgt. J.A.S. Laroque of the RCMP

Présentement, l'OBTI test n'est pas encore une méthode utilisée par le laboratoire forensique de la GRC pour déterminer l'origine humaine ou animale du sang. Cette étude a été menée dans le but de valider l'efficacité de ce nouveau test afin de l'incorporer au matériel du technicien en scène de crime de la Sûreté du Québec.

Matériel et Méthode

Provenance de l'échantillon mère de sang humain :

Suite à une entente avec le Laboratoire de Sciences Judiciaires et Médico-Légales (Montréal, Québec), une éprouvette de sang humain fut récupérée à la morgue suite à une autopsie pour les fins de la recherche. Le sang fut ensuite détruit après les expérimentations.

Échantillons de sang :

#	Description
1-	≈ 1 µl sang humain ² / 10 ml H ₂ O
2-	≈ 5 µl sang humain ² / 10 ml H ₂ O
3-	≈ 100 µl sang bœuf ³ / 10 ml H ₂ O
4-	Sang humain ² non dilué sur carton buvard
5-	Sang de bœuf ³ non dilué sur carton buvard
6-	Sang humain ² non dilué traité au luminol sur carton buvard

Procédure :

Des essais révélateurs de l'OBTI-test furent effectués précédemment avec du sang de Chimpanzé (*Pan troglodytes*), de Gorille (*Gorilla gorilla*), d'Orang-outan (*Pongo pygmaeus*), de Macaque noir de Célèbes (*Cynopithecus niger*) et de Singe araignée (*Ateles sp*) par Hochmeister et al. [4] ainsi que par Hermon et al. avec du sang de Chameau (*Camelus bactrianus*), d'Âne (*Equus asinus*), de Pigeon (*Columba livia*), de Poulet (*Gallus gallus*), de Chat (*Felis catus*), de Chien (*Canis familiaris*), de Chèvre (*Capra hircus*), de Moutons (*Ovis aries*), de Dinde (*Meleagris gallopavo*), de Cheval (*Equus caballus*),

used by crime scene technicians in the Sûreté du Québec.

Materials and Methods

Source of original blood sample:

Following an agreement with the Laboratoire de Sciences Judiciaires et Médico-Légales (Montréal, Québec), a test tube of human blood, for research purposes, was recovered from the morgue following an autopsy. The blood was destroyed following the experiments.

Blood samples:

#	Description
1-	~ 1 µL of human blood ² / 10 mL of water
2-	~ 5 µL of human blood / 10 mL of water
3-	~ 100 µL of cow blood ³ / 10 mL of water
4-	Human blood, undiluted, on a cardboard blotter
5-	Cow blood, undiluted, on a cardboard blotter
6-	Human blood, undiluted, treated with luminol, on a cardboard blotter

Procedure:

Previous experiments with the OBTI test have been carried out with blood samples from chimpanzee (*Pan troglodytes*), gorilla (*Gorilla gorilla*), orangutan (*Pongo pygmaeus*), Celebes black ape (*Cynopithecus niger*) and spider monkey (*Ateles sp*) by Hochmeister et al. [4], while Hermon et al. [2] carried out experiments with blood from camel (*Camelus bactrianus*), donkey (*equus asinus*), pigeon (*Columba livia*), chicken (*Gallus gallus*), cat (*Felis catus*), dog (*Canis familiaris*), goat (*Capra hircus*), sheep (*Ovis aries*), turkey (*Meleagris gallapavo*), horse (*Equus caballus*), ostrich (*Struthio camelus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), trout (*Oncorhynchus mykiss*), squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), lemur (*Lemur sp.*), and mountain gazelle (*Gazella*

² Homo sapiens sapiens

³ Bos taurus

² Homo sapiens sapiens

³ Bos taurus

d'Autruche (*Struthio camelus*), de Lapin (*Oryctolagus cuniculus*), de Truite (*Oncorhynchus mykiss*), de Singe écureuil (*Saimiri sciureus*), de Lémur (*Lemur sp.*) et de Gazelle des montagnes (*Gazella gazella*) [2]. Nous avons donc décidé que nos essais seraient réalisés avec du sang humain et du sang de bovin seulement. Le test Hexagon OBTI a été effectué selon des procédures adaptés selon la documentation du produit [5]. À l'aide du bâton collecteur fixé au bouchon rouge du tube d'échantillon, les taches de sang sont grattées légèrement et l'échantillon est inséré dans le tube en visant le bouchon fermement. Le tube est ensuite agité. La pointe de l'extrémité extérieure rouge du bouchon est ensuite brisée. Le trou ainsi créé permet de distribuer 2 gouttes de solution d'échantillon dans la zone S du support test. Un temps d'environ 5 minutes doit être alloué avant la lecture du test.

Résultats et discussions :

Lors des tests avec le sang humain, nous avons pu constater que, même avec une très faible concentration de sang, le OBTI test donnait de très bons résultats. À une concentration de 1 μ l de sang / 10 ml d'eau, on aperçoit bien la ligne positive, malgré sa faible intensité (voir figure 1)

L'intensité de la ligne positive de l'OBTI-test est directement proportionnelle à la quantité d'hémoglobine humaine dans l'échantillon. Ainsi, lorsqu'on augmente la concentration de sang, l'intensité de la ligne positive augmente sensiblement (voir figure 1).

gazella). It was decided that the present series of experiments would only use human blood and cow blood. The Hexagon OBTI test was performed according to the procedures outlined in the documentation that came with the product [5]. Using the collection wand attached to the red stopper of the sampling tube, bloodstains were gently scraped and a sample was placed into the tube and tightly stoppered. The tube was then shaken. The end of the red stopper was snapped off, and two drops of sample solution were placed in the S region of the sample plate. A reading was taken after a wait time of approximately five minutes.

Results and Discussion

From the tests with human blood, the OBTI test gave good results, even at very low concentrations. At a concentration of 1 μ L of blood/ 10 mL of water, one could see the positive line, although it was very weak (see Figure 1).

The intensity of the positive line of the OBTI test is directly proportional to the amount of hemoglobin in the sample. If the concentration of blood increases, the intensity of the line increases accordingly (see Figure 2).

With regards to specificity, there was a total absence of reaction for the tests carried out with the cow blood, whether on the blotter or in liquid form (see Figure 3).

It could also be shown that previous treatment of the sample with luminol did not affect the results of the test (see Figure 4).



Figure 1. Result for 1 μ L of human blood (*Homo sapiens sapiens*) /10 mL of water
Figure 1 : Résultat de \approx 1 μ l sang humain (*Homo sapiens sapiens*) / 10 ml H₂O

Au niveau de la spécificité, on observe une absence totale de réaction sur les tests réalisés avec du sang de bovin, qu'il soit sur carton buvard ou à l'état liquide (voir figure 3).

According to the literature, the OBTI test has a sensitivity to human hemoglobin down to a concentration of $0.05 \mu\text{g} / \text{mL}$ [6], while the Hemastix are sensitive to hemoglobin to a concentration of 150 to

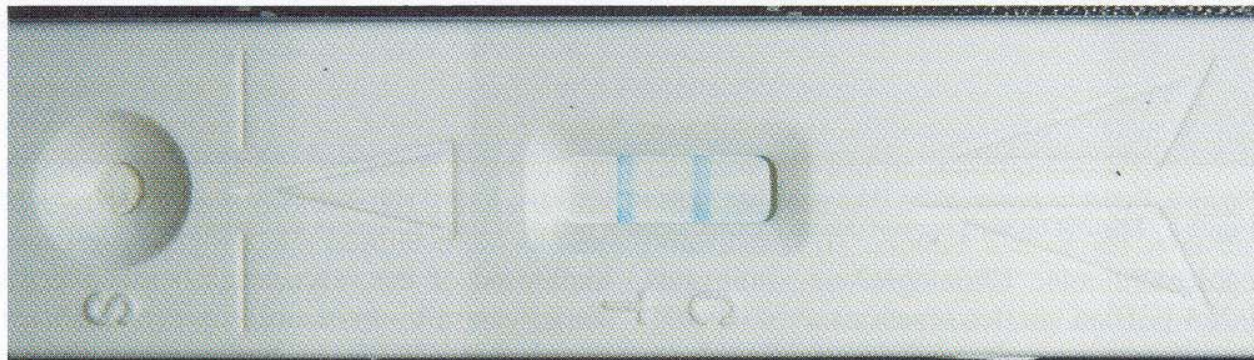


Figure 2. Result for human blood (*Homo sapiens sapiens*), undiluted, on a cardboard blotter
Figure 2 : Résultat du sang humain (*Homo sapiens sapiens*) non dilué sur carton buvard

Nous avons également pu démontrer que le traitement préalable de l'échantillon avec le luminol n'influence pas les résultats du test (voir figure 4).

La littérature parle de sensibilité à l'hémoglobine humaine dans une proportion de $0,05 \mu\text{g} / \text{ml}$ pour l'OBTI test [6] alors que

$620 \mu\text{g} / \text{mL}$ [1]. In the case of Hemastix, the reaction is called a non-specific reaction with hemoglobin, for all mixtures of species, and with many false positive reactions with oxidizers and peroxidase [1]. On the other hand, validation tests of the OBTI test have shown it to be very specific to

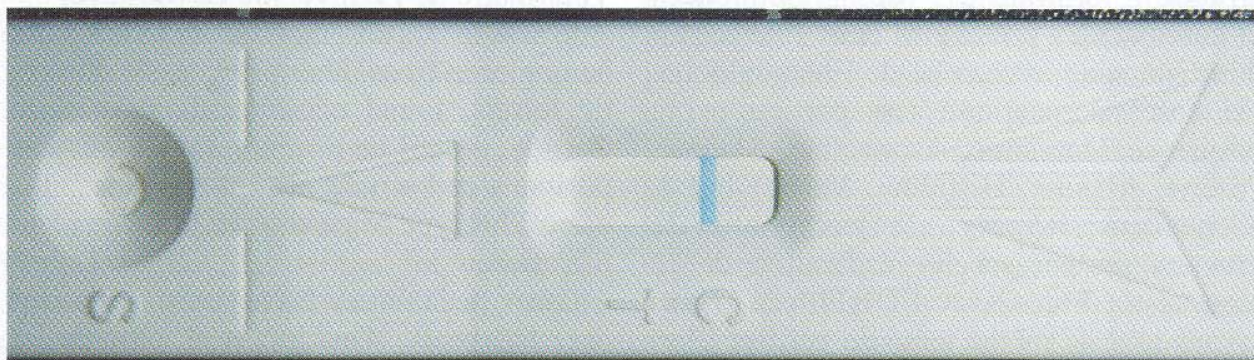


Figure 3. Result for cow blood (*Bos taurus*), undiluted, on a cardboard blotter
Figure 3 : Résultat du sang de bœuf (*Bos taurus*) non dilué sur carton buvard

l'hémastix est sensible à l'hémoglobine à une concentration de 150 à $620 \mu\text{g} / \text{ml}$ [1]. Dans le cas de l'hémastix, on parle d'une réactivité non spécifique avec l'hémoglobine, toutes espèces confondues, ainsi que plusieurs réactions de faux positifs avec les substances oxydantes et la peroxydase [1]. Au contraire, les tests de validation de l'OBTI test en laboratoire privé montre une très haute spécificité à l'hémoglobine humaine [4, 6].

Malgré que l'OBTI test réagisse efficacement avec l'hémoglobine humaine, il réagit

human hemoglobin [4,6].

Although the OBTI test reacts efficiently with human hemoglobin, it will also react with simian hemoglobin [2,4]. However, the reaction with primate blood does not really present a problem in this country since no other species of primate are indigenous to Canada, although one might find them in zoos or research centres.

According to Rowley [7], there is also the possibility of a reaction with hemoglobin from ferrets (*Mustela puterius fero*). In this case, Rowley's work described the

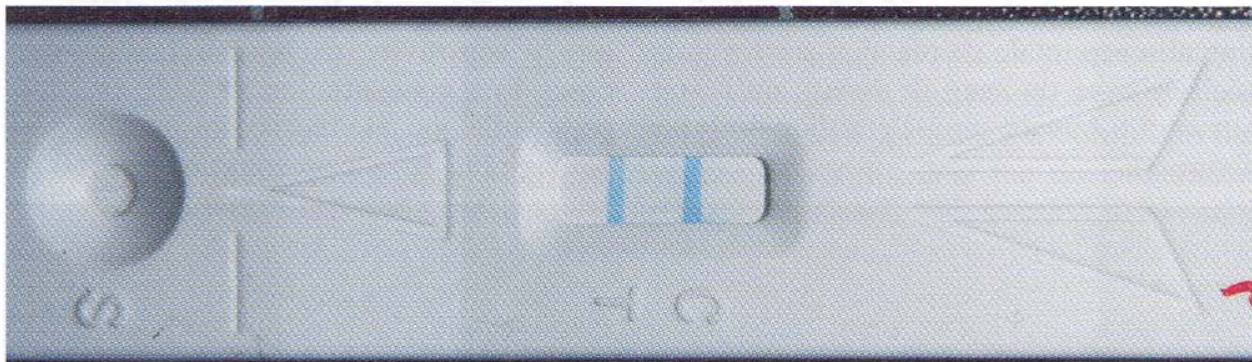


Figure 4. Result for human blood (*Homo sapiens sapiens*), undiluted, treated with luminol, on a cardboard blotter
 Figure 4 : Résultat du sang humain (*Homo sapiens sapiens*) non dilué traité au luminol sur carton buvard

également avec l'hémoglobine simiesque [2, 4]. Bien sûr, les réactions avec le sang de primate ne présentent pas vraiment de problème dans notre pays, car aucune espèce de primate n'est indigène au Canada, mais on peut en retrouver dans les zoos et dans certains centres de recherche.

Selon Rowley, il existe également une possibilité de réactivité avec l'hémoglobine de furet domestique (*Musela puterins fero*) [7]. Dans ce cas, les écrits de Rowley décrivent une réactivité potentielle due à la grande similarité des séquences d'acides aminés protéiques dans l'hémoglobine humaine avec celle de l'hémoglobine de furet domestique (en particulier la séquence Thréonine, Asparagine, Alanine, Valine, Alanine, Histidine, Valine) [7]. Cependant, Rowley n'a pas publié de travaux portant sur la vérification de ce constat théorique avec l'OBTI-test. Nous avons tout de même tenté de vérifier l'hypothèse, mais il nous a été impossible de mettre la main sur des échantillons de sang de furet, malgré nos tentatives auprès de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal.

Donc, il semble que l'interaction croisée avec l'hémoglobine de primate ou celle des furets domestiques, animaux de compagnie occasionnels au Canada, demeure de faux positifs mineurs et n'empêche en rien l'utilisation d'un tel produit dans nos pratiques courantes en identité judiciaire.

Plusieurs autres tests furent proposés au fil des années. Premièrement, Quarino et al. ont proposé une technique originale de radioimmunoanalyse efficace [8] qui don-

likelihood of the reaction as being due to the great similarity in amino acid sequences of proteins between human and ferret hemoglobin (in particular, the sequence threonine, asparagine, alanine, valine, alanine, histidine, valine) [7]. However, Rowley has not published any work concerning the verification of this hypothesis with the OBTI test. We had hoped to test this hypothesis as well, but it was not possible to obtain samples of ferret blood, even after enquiring at the Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal.

It would appear that the reaction with hemoglobin from other primates or domestic ferrets, found occasionally as pets in Canada, would be a minor source of false positives and would not interfere with the use of this type of product in forensic identification.

Other techniques have been proposed over the years. Quarino et al. proposed a novel technique using radioimmunoassay [8] which produced very precise results. On the other hand, the technique required the use of radioactive anti-human hemoglobin antibodies. The radioactivity involved with this technique prevents its use in the field due to the obvious problems related to health and safety, and training.

Spear et al developed another test specific to primate hemoglobin called HemeSelect™ (SmithKline Diagnostics, San Jose, CA) [9]. This technique uses anti-human hemoglobin antibodies in a process called Reverse Passive Haemagglutination Assay (RPHA). However, according to Hochmeister et al.,

nait des résultats très précis. Par contre, celle-ci nécessitait l'utilisation d'anticorps anti-hémoglobine humaine radioactifs... La radioactivité de cette technique empêchait donc son utilisation sur le terrain pour des raisons évidentes de santé, de sécurité et de formation.

Pour leurs part, Spear et al. ont développé un autre test spécifique à l'hémoglobine de primate nommé HemeSelect™ ; SmithKline Diagnostics, San Jose, CA [9]. Ce dernier consistait en l'utilisation d'anticorps anti-hémoglobine humaine dans un processus d'hémagglutination passive inversé (RPHA : Reverse Passive Haemagglutination Assay). Cependant, selon Hochmeister et al., la complexité de cette technique demandant plusieurs manipulations de laboratoire a découragé plusieurs intervenants.

Dans son cas, le OBTI-test est plus simple, plus rapide, plus sensible et ne demande pas de manipulation de laboratoire [4]. Ces raisons semblent facilement expliquer pourquoi l'OBTI-test est plus intéressant dans une optique forensique que pouvait l'être jadis le HemeSelect ou la Radioimmunoanalyse.

Dans la famille des immunochromatographies, il existe un autres test appelé Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace®. Ce dernier fut validé par Johnston et al. [10] en 2003 et semble donner des résultats très similaires au OBTI-test malgré une sensibilité légèrement inférieure (0,05 µg pour OBTI versus 0,07 µg pour HemaTrace). Une future étude de comparaison des deux techniques pourrait s'avérée intéressante.

Sous un angle moins théorique, l'OBTI-test permet d'accroître l'efficacité sur le terrain en limitant le nombre de prélèvement de faux positifs. Ceci aurait encore plus d'importance lors de scènes de crime impliquant des êtres humains vivant avec des animaux domestiques ou de ferme, des êtres humains vivant de chasse et pêche à l'année (Inuits ou Amérindiens) ou des êtres humains travaillant dans des abattoirs ou usines de traitement de viande. Dans

the complexity of the technique, requiring a great deal of laboratory manipulations, has discouraged most other investigators.

In the case of the OBTI test, it is very simple, very quick, and very sensitive, and requires no laboratory manipulation [4]. For these reasons, it is easy to see why it is more interesting from a forensic perspective, compared to the older methods of HemeSelect and radioimmunoassay.

In the family of immunochromatographies, there is another test called Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace®. This technique was validated by Johnston et al [10] in 2003, and appears to give results similar to the OBTI test, but with a slightly poorer sensitivity (0.05 µg for OBTI versus 0.07 µg for Hema Trace). Future studies comparing these two techniques would be of interest.

From a less theoretical point of view, the OBTI test should allow for an increase in efficiency in the field by limiting the number of false positives. This would be especially important for crime scenes in which people have pets or live on a farm, where people regularly hunt and fish (e.g. Inuit or native communities), or when the people involved work in slaughterhouses or meat packing plants. In these situations, the OBTI test allows for a simple and effective differentiation between human and animal blood, limiting any waste of time and money taking samples related to false positives. Some examples might include:

- Murder in a residence up North where one might find residue from animal slaughter
- Murder in a building on a farm
- Murder in a house where a pet has been injured or killed
- Hunting accidents

This test would be especially useful in these cases, but it will also be useful in all cases where Hemastix might have been used previously. Indeed, Hemastix remains an effective presumptive test for blood, and the OBTI test could be seen as a major addition in confirming the presence of human blood.

ces situations, le test OBTI permet une différenciation facile et efficace entre le sang humain et animal de façon à limiter les pertes de temps et d'argent reliées aux prélèvements de faux positifs. Voici quelques exemples concrets de scènes :

- Meurtre dans une résidence dans le grand nord où on retrouve des résidus de coupe de viande
- Meurtre dans un bâtiment de ferme
- Meurtre dans une résidence où un animal de compagnie est blessé ou tué
- Accident de chasse

Ce test serait donc utile dans ces cas spécifiques, mais aussi dans tous les cas où l'hémastix aurait été utilisé auparavant. Bien sûr, l'hémastix demeure un test présumptif efficace pour détecter le sang et l'OBTI test serait un ajout majeur dans la confirmation de présence de sang humain.

Conclusion

Suite à cette étude et à plusieurs essais sur le terrain, il appert que l'OBTI-test est une technique confirmatoire efficace et très spécifique au sang humain. Ses caractéristiques en font un test complémentaire à l'hémastix et/ou au luminol d'une très grande valeur qui permet de limiter au maximum le prélèvement de faux positifs pour l'ADN. Nous en venons donc à la conclusion que ce nouveau test, disponible désormais au Canada, doit être incorporé à la trousse de luminol des techniciens en scènes de crime de la Sûreté du Québec.

Conclusion

Following this study and other trials carried out in the field, it appears that the OBTI test is an effective confirmatory technique that is especially specific for human blood. Its characteristics make it a good complementary test to Hemastix and/or luminol, with its greatest value being in limiting the collection of false positive samples for DNA processing. This new test, which will now be available in Canada, will be incorporated into the luminol kits belonging to crime scene technicians of the Sûreté du Québec.

Pour plus d'information, communiquez avec:

Alexandre Beaudoin B.Sc.
Conseiller Scientifique en Identité Judiciaire
Sûreté du Québec
Service de l'Identité Judiciaire
1701 Parthenais
Montréal (Québec) CANADA H2K 3S7
Téléphone : 514-598-4513
Télécopieur : 514-596-3668
alexandre.beaudoin@surete.qc.ca

Références

- 1- Product literature. Urinalysis Reagent Strips. Bayer Inc., Healthcare Division, Toronto, Ontario, H9W 1G6, Canada. 2001
- 2- Hermon, D.; Shpitzen, M.; Oz, C.; Glattstein, B.; Azoury, M.; Gafuy, R. The Use of the Hexagon OBTI Test for Detection of Human Blood at Crime Scenes and on Items of Evidence Part I: Validation Studies and Implementation. *J. For. Ident.* 2003, 53 (5), 566-575
- 3- Hermon, D.; Azoury, M. The Use of the Hexagon OBTI Test for Detection of Human Blood at Crime Scenes and on Items of Evidence Part II: Use on Amido Black Treated Surfaces. *J. For. Ident.* 2003, 53 (5), 576- 584
- 4- Hochmeister, M.N.; Budowle, B.; Sparkes, R.; Rudin, O.; Gehrig, C.; Thali, M.; Schmidt, L.; Cordier, A.; Dirnhofer, R. Validation Studies of an Immunochromatographic 1-step Test for the Forensic Identification of Human Blood. *J. For. Sci.* 1999, 44 (3), 597-601
- 5- Product literature. Hexagon OBTI. Occult Blood Test Immunological. Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbH, Max-Planck-Rink 21, D-65205 Wiesbaden, Germany. 2002.
- 6- Validation report. Verification Report for HEXAGON OBTI (Fecal Occult Blood Test). Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbH, Max-Planck-Rink 21, D-65205 Wiesbaden, Germany. 2003.
- 7- Rowley, B.O. Commentary on "Hochmeister, M.N.; Budowle, B.; Sparkes, R.; Rudin, O.; Gehrig, C.; Thali, M.; Schmidt, L.; Cordier, A.; Dirnhofer, R. Validation Studies of an Immunochromatographic 1-step Test for the Forensic Identification of Human Blood. *J. For. Sci.* 1999, 44 (3), 597-601". *J. For. Sci.* 1999, 44 (6), 1323.
- 8- Quarino, L.; Kobilinsky, L. Development of a Radioimmunoassay Technique for the Detection of Human Hemoglobin in Dried Bloodstain, *J. For. Sci.* 1988, 33 (6), 1369-1378
- 9- Spear, T.F.; Binkley, S.A. The HemeSelect Test: a Simple and Sensitive Forensic Species Test. *J. For. Sci.* 1994, 34 (1), 41-46.
- 10- Johnston, S.; Newman, J.; Frappier, R. Validation Study of the ABACUS Diagnostics ABACard® HemaTrace® Membrane Test for the Forensic Identification of Human Blood. *Can. Soc. Forens. Sci. J.* 2003, 36 (3), 173-183.