

## Microbiología forense

**Antonio Santos de la Sen. Ignacio Belda Aguilar. Luis Gamella Pozuelo.  
Alejandro Alonso Conde. Domingo Marquina Díaz.**

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.  
[ansantos@bio.ucm.es](mailto:ansantos@bio.ucm.es)    [dommarq@bio.ucm.es](mailto:dommarq@bio.ucm.es)

**Resumen:** las ciencias forenses comprenden hoy en día un conjunto de técnicas que incluyen la investigación policial, judicial y científica y que tienen como finalidad la consecución de pruebas a efectos judiciales. La [Microbiología Forense](#), es una disciplina de reciente aplicación en criminalística que proporciona nuevas herramientas para poder resolver las dudas que acontecen tanto en los procesos de muerte natural como violenta.

**Palabras clave:** Microbiología. Ciencia forense. Paleomicrobiología.

### INTRODUCCIÓN

La Microbiología Forense, es una disciplina que proporciona nuevas metodologías con el fin de resolver o explicar muchos sucesos de muerte natural como violenta. Sin embargo, la Microbiología Forense es algo más que eso, pues permite determinar la impronta de microorganismos en restos cadavéricos muy antiguos y poder así determinar si la causa del fallecimiento fue por causas infecciosas o no. Permite conocer qué microorganismos intervienen en los procesos relacionados con la descomposición cadavérica, facilitando la determinación del ámbito temporal de la muerte. También, y después de los últimos atentados terroristas a nivel internacional, la Microbiología Forense juega un importante papel a la hora de proteger y determinar los posibles agentes biológicos empleados en un ataque terrorista en periodo de paz o en una contienda bélica (Breeze, 2005).

Así pues hay tres aspectos destacables cuando se abordan los procesos que estudia la Microbiología Forense.

1. Los microorganismos implicados en los procesos de [descomposición cadavérica](#).
2. La [Paleomicrobiología Forense](#).
3. La Microbiología Forense empleada en la identificación y prevención de [ataques biológicos](#).

## LOS MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE DESCOMPOSICIÓN CADAVERICA

Antes de comenzar a estudiar los microorganismos que están implicados en los procesos de descomposición cadavérica y como estos pueden proporcionar datos sobre el cadáver, es necesario definir que es la microbiota normal del ser humano.

El hombre como individuo está compuesto por  $10^{14}$  células, de las cuales sólo el 10% forman parte de los tejidos, el resto corresponde a microorganismos asociados, no patógenos que viven habitualmente en el cuerpo sano y que constituyen la microbiota normal. Estos microorganismos se pueden localizar en numerosos lugares: piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal, vías respiratorias, oído externo, conjuntivas y tracto genitourinario, e intervienen en procesos beneficiosos para el ser humano, tales como la digestión de los alimentos, la producción de vitaminas o la protección por competencia con otros microorganismos patógenos, o simplemente conviven con él. Así pues la microbiota normal y el ser humano tienen una relación de tipo simbiótica. Esta relación es beneficiosa para ambos hasta que sobreviene el fallecimiento del ser humano.

La muerte no puede considerarse desde el punto de vista biológico como un momento, sino como un proceso, pues no todos los sistemas vitales cesan a la vez. Lo que socialmente se considera como el proceso de la muerte podría definirse como el cese súbito e irreversible de las funciones respiratorias, cardiocirculatorias y neurológicas.

Es justo en ese momento en el que la asociación entre el ser humano y las bacterias se convierte en un proceso de tipo predativo, y comienzan los denominados procesos cadavéricos que no son otra cosa que las transformaciones que se suceden en el cadáver por acción de los factores ambientales. Los fenómenos cadavéricos pueden clasificarse dos en función del tiempo en el que se desarrollan.

### Fenómenos cadavéricos tempranos

Los primeros procesos cadavéricos se suceden inmediatamente tras producirse la muerte, y comienzan por la acidificación de los tejidos debido a la ruptura celular y la consiguiente salida del contenido de las vacuolas digestivas de las mismas al medio extracelular. Este efecto va acompañado por el enfriamiento progresivo del cuerpo (*algor mortis*). A las dos horas, manos, pies y cara están frías, a las cuatro horas este fenómeno se aprecia en las partes cubiertas, y las 8 horas de la muerte puede alcanzar los 29°C y a las 15 horas descender a los 23°C. Estos datos son importantes a la hora de poder determinar la data (hora) de la muerte. Por eso la temperatura cadavérica se debe tomar en varios puntos del cadáver (recto, cavidad del oído, cavidad nasal o intravisceralmente), y se deben aplicar la [ecuación de Glaister y Rentoul](#), que permite establecer el tiempo postmortem:

$$\text{Tiempo postmortem} = \frac{36,8 - \text{Temperatura rectal}}{0,8}$$

Claro está que estos valores dependen de las condiciones ambientales externas, y el descenso de temperatura puede ser más leve en ambientes tropicales, o más abrupto en ambientes fríos. La deshidratación cadavérica se produce por la pérdida de líquido por evaporación en los tejidos, es más acusada en niños que en adultos, pudiendo llegar a valores de 8 g/kg/día, aunque por término medio se pierden en torno a 18 g de agua en un individuo adulto (Fernández, 2008).

La **hipostasia** postmortem es otro indicio de los fenómenos cadavéricos tempranos, consiste en la deposición de la sangre corporal en el tercio inferior del cadáver cuando se encuentra en posición supina. Se presenta entre las 3 y las 24 horas de haber sucedido el deceso. Se caracteriza en los primeros momentos por la aparición de un color verde azulado que evoluciona a violeta oscuro. Sirve para establecer la data de la muerte, su diagnóstico y la posición del cadáver. En algunos casos no se aprecia nunca la hipostasia, como ocurre especialmente en individuos con anemias agudas, ancianos y lactantes. El color de la hipostasia varia:

- Color rosa oscuro, púrpura intenso o azul: Cuando hay hipostasia congestiva.
- Color rojo cereza: en casos de envenenamiento por monóxido de carbono.
- Color rojo intenso o ladrillo: Por envenenamiento por cianuro.

Desde el punto de vista judicial es muy importante pues permite determinar la posición en la que ha permanecido el cadáver, permite realizar el cálculo de la data de la muerte, y determina si ha habido algún movimiento voluntario del cadáver antes de su levantamiento. La hipostasia comienza en el dorso del cuello alrededor de los 45 minutos, en el resto del cadáver tarda entre 3 a 5 horas después de la muerte. A las 8 horas, estas manchas son fácilmente eliminadas por un masaje intenso, pero no desaparecen transcurridas más de 12 horas.

La **rigidez cadavérica** (*rigor mortis*) es un estado de dureza y retracción de los tejidos que sobreviene en los músculos tras el fallecimiento. La causa de la rigidez es la precipitación de la miosina muscular que aparece entre 3 y 6 horas después de la muerte. La rigidez comienza a las dos horas en el corazón y en el diafragma. También se produce de forma simultánea en los músculos de la mandíbula inferior y los de las órbitas de los ojos, para extenderse al resto de la cara, cuello, tórax y después se extiende a los miembros inferiores. La pupila, que se dilata en el momento de la muerte, se contrae con la rigidez, lo mismo que ocurre con las vesículas seminales y el útero (Di Maio, 2001).

### **Fenómenos cadavéricos tardíos**

Se consideran aquellos procesos que producen la destrucción del cadáver. Entre los que encontramos **autolisis, tanatoquimia y putrefacción**.

- **Autólisis**

Es el conjunto de procesos fermentativos anaeróbicos que se desarrollan en el interior de la célula por acción de las enzimas intracelulares **sin** intervención microbiana. Se trata de procesos previos a la putrefacción, aunque a veces se superponen. Dependen de factores ambientales y de tratamientos médicos (Fig. 1).



Figura 1. Resistencia a la autólisis de distintos órganos del cuerpo.

- **Tanatoquimia**

Se definen como los procesos bioquímicos propios de la actividad cadavérica. Al realizar la autopsia de forma rápida tras la muerte, se pueden valorar la mayor parte de los parámetros bioquímicos, sobre todo aquellos que tienen un valor diagnóstico y pueden informar sobre la forma de la muerte (glucosa, urea, creatinina, electrolitos, enzimas, antígenos y anticuerpos, hormonas, etc.).

La toma de muestras para realizar la valoración de estos parámetros es importante. De forma general se toma sangre del ventrículo derecho, pero esta suele contaminarse fácilmente pues recibe la sangre de las cavas que se contaminan por la degradación del páncreas y los fluidos digestivos e intestinales. Por ello, es mejor tomar muestras de fluidos de sitios cerrados tales como: líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, humor vítreo, líquido sinovial, líquido pericárdico y líquido perilinfático. De todos ellos, el humor vítreo es el que tiene más ventajas. Entre los dos ojos se pueden extraer unos 4-5 ml de fluido, suficiente para poder valorar: glucosa, ácido láctico, compuestos nitrogenados (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos), enzimas (fosfatasa ácida o alcalina, amilasa, transaminasas, etc.), lípidos, hormonas (catecolaminas, cortisol, tiroxina, etc.) o electrolitos (sodio, cloro, calcio, etc.).

- **Putrefacción**

La **putrefacción** es el signo inequívoco de que se ha producido la muerte de un individuo, únicamente se produce en cadáveres. Se produce por la degradación

de los tejidos del cadáver por acción de los microorganismos. Estos microorganismos pueden tener una procedencia diversa:

- Microorganismos ambientales.
- Microorganismos de infecciones.
- Microorganismos de la microbiota normal.
  - Tracto digestivo (ciego).
  - Tracto respiratorio.
  - Piel.

Los microorganismos encargados de los procesos de descomposición siguen un orden determinado. En primer lugar actúan los microorganismos aerobios (bacterias y hongos filamentosos), seguidos por las bacterias anaeróbicas facultativas presentes en el tracto gastrointestinal, para concluir con las bacterias anaeróbicas estrictas (Campobasso, 2004).

A lo largo del proceso de putrefacción cadavérica, se origina la descomposición a través de procesos oxidativos y fermentativos de las grasas, hidratos de carbono y proteínas del organismo, generando compuestos malolientes como ácido sulfhídrico, mercaptanos, indol escatol, amoníaco y aminas de tipo cadaverina y putrescina (Galloway, 1998).

### **Fases de la descomposición cadavérica**

Podemos definir descomposición, como el proceso macroscópico resultante de los procesos bioquímicos propios de un organismo carente de vida o de los microorganismos que se encuentran sobre él mismo. Estos procesos implican procesos autolíticos, fermentativos y de respiración anaeróbica. Todos estos procesos van encaminados a la transformación de moléculas complejas (proteínas, hidratos de carbono y grasas) en moléculas más sencillas para su reciclaje medioambiental.

Existen cuatro etapas desde el punto de vista médico-legal (forense) que permiten clasificar los fenómenos que se producen a lo largo del proceso de la descomposición cadavérica. Estos se denominan **periodo cromático**, **enfisematoso**, **colicuativo** y **esqueletización**.

- **Periodo cromático**

Es considerado el primer signo de la descomposición cadavérica. A nivel macroscópico comienza con la llamada mancha verde. Esta mancha se inicia normalmente en la fosa iliaca derecha entre las 24 a 48 horas después de la muerte, y se extiende en los dos siguientes días por todo el cuerpo adquiriendo este una tonalidad verde parduzca.

Esta mancha se origina por la descomposición de la hemoglobina por parte de las bacterias coliformes y especies del género *Clostridium*, que producen metahemoglobina, de un color azulado, y la acción del *Micrococcus prodigiosus* y el *Bacterium violaceum*, que provocan manchas violetas. En los fetos, las bacterias penetran por los orificios naturales, principalmente por las vías respiratorias, por lo que la mancha verde aparece en el cuello y la parte superior del tórax. En los cuerpos que presentan lesiones supurativas o neoplásicas, la mancha verde aparece alrededor de las lesiones.

En esta fase las bacterias aerobias del tracto respiratorio empiezan a desarrollarse a partir de exudados pulmonares, sangre pulmonar y líquido pleural. Los microorganismos intestinales rompen los epitelios por acumulación de gas debido a los procesos fermentativos, se produce la liquefacción del contenido intestinal, y se consume todo el oxígeno presente en el sistema digestivo. Los desechos metabólicos debidos a la actividad microbiana empiezan a aparecer como las aminas secundarias (putrescina y cadaverina), ácido sulfhídrico, otros gases como el metano y el hidrógeno. En el caso de las mujeres embarazadas, debido a la acumulación de gases en la cavidad abdominal se produce la expulsión del feto. *Bacillus putricum* acaba con el oxígeno existente y comienza la fase anaerobia estricta.

- **Periodo enfisematoso**

En este periodo se acumulan una gran cantidad de gases como productos de la fermentación de los hidratos de carbono y la desaminación de las proteínas. Se produce la desfiguración casi completa del cadáver por acumulación de los propios gases, los tejidos se hinchan, y en casos extremos pueden llegar a explotar por la presión. Los vasos sanguíneos quedan muy marcados sobre la superficie de la piel.

Durante esta fase predominan las bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas (dentro de las cavidades) y aparecen hongos filamentosos sobre la superficie del cadáver.

Como consecuencia de los procesos fermentativos se aprecia una infiltración gaseosa en el tejido celular subcutáneo, se hincha la cabeza y se protruyen los globos oculares, la lengua se sale fuera de la boca, el tórax y el abdomen aparecen distendidos, los genitales externos multiplican su tamaño por diez, las venas superficiales son presionadas por las vísceras y aparecen con un color violáceo intenso. El periodo de duración es de aproximadamente quince días.

- **Periodo colicuativo**

En este periodo se producen ampollas repletas de líquidos productos de los [procesos putrefactivos](#). A nivel interior, todavía se pueden distinguir órganos en el interior del cuerpo, se produce el desprendimiento del pelo y la piel se

desprende por simple tracción, la piel se ennegrece, los globos oculares se protruyen hacia el exterior. Las bacterias que predominan en esta fase son anaeróbicas estrictas (*Clostridium* y *Fusobacterium*) y anaerobias facultativas (*Escherichia coli*).

La cantidad de gas producido es tal que se suele producir la ruptura de la pared abdominal, se rompen también las asas intestinales con la liberación de su contenido, los órganos se desintegran y las partes blandas de la cara desaparecen. Al final de esta fase se produce la licuefacción del cadáver. Si se realiza la exhumación del cadáver hay que tener mucho cuidado al abrir el féretro, si es de madera, hay que tener precaución al desmoldar la tapa. En el caso de que sea metálico, hay que abrir la válvula de seguridad, pues existe riesgo de explosión. Esta fase viene a durar entre 8 a 10 meses (Shepherd, 2003).

- **Periodo de esqueletización**

En este periodo no existe actividad microbiana, pues se origina por la desaparición de las partes blandas del cadáver. En la fase inicial queda el putrúlagos (restos orgánicos aún no desintegrados), a continuación desaparecen los ligamentos y cartílagos hasta la completa desintegración de la materia orgánica quedando únicamente restos óseos. Este proceso tiene una duración que oscila entre 2 y 5 años según el lugar en el que se encuentre el cadáver (enterrado, con ataúd, sumergido) y las condiciones ambientales (humedad, temperatura y estación del año).

## **CONDICIONES QUE MODIFICAN LA EVOLUCIÓN DEL PROCESO DE DESCOMPOSICION**

En el proceso de descomposición de los cadáveres, intervienen tanto factores individuales como factores medio ambientales.

### **Factores individuales**

Los factores individuales son aquellos que atañen al propio cadáver y no se ven modificados por acción de otros agentes externos.

**Constitución corporal:** la delgadez extrema favorece los procesos de conservación por momificación espontánea, mientras que en los cuerpos obesos se acelera el proceso de descomposición microbiana.

**Edad:** los cadáveres de los niños se descomponen con mayor rapidez que los de los adultos, aunque en algunos casos se favorecen los procesos de momificación natural.

**Toxicológicos:** la presencia de fármacos como los antibióticos ralentizan el proceso de descomposición por el efecto inhibitor sobre el crecimiento de los microorganismos.

**Presencia de heridas premortem:** por arma blanca, balas o traumáticas, favorecen los procesos de contaminación por microorganismos acelerando el proceso de descomposición.

**Presencia del cuerpo completo:** de forma que las partes del cadáver (miembros) se descomponen más lentamente que el cadáver completo.

**Estado de salud:** el buen estado de salud, ralentiza el proceso de descomposición. En casos de intoxicación por metales pesados, cianuro, arsénico, etc. la descomposición puede retrasarse indefinidamente.

**Otros:** como es el caso de la presencia de ropa (que retrasa la velocidad de descomposición) o la presencia de ataúd (ralentiza la descomposición).

### **FACTORES AMBIENTALES**

Son aquellos factores debidos a la acción de la atmósfera y la localización geográfica del cadáver. Estos factores pueden resultar cruciales a la hora de establecer la data de la muerte (tiempo en el que se ha producido la muerte). Indudablemente, y dependiendo de estos factores, los procesos de descomposición cadavérica se pueden ver acelerados o retardados, por ello, dentro de las ciencias forenses es muy importante tener en cuenta estos factores pues pueden facilitar o dificultar los procesos de investigación en una muerte (Tabla 1).

**Temperatura:** es un factor clave, pues dependiendo del rango de temperatura externa se va a permitir el desarrollo de algunos grupos de microorganismos. Como ya sabemos, el frío ralentiza la descomposición pues inhibe el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos que intervienen en los procesos de descomposición cadavérica. El calor seco, cuando es extremo (más de 50°C) tiene también un efecto conservante, pues facilita la desecación de los tejidos, y favorece la inhibición de los [microorganismos descomponedores](#).

**Humedad:** es un factor muy importante, pues a medida que esta aumenta, los restos orgánicos tienden a absorber agua, esta está libre en los tejidos y permite su utilización por los microorganismos descomponedores. De forma general, la presencia de agua en el cadáver acelera su descomposición (Dent, 2004).

Factores que afectan a la velocidad de descomposición cadavérica	
Factores que aceleran	Factores que retardan
Presencia de oxígeno	Ausencia de oxígeno
Temperatura templada 15-37°C	Temperaturas frías < 10°C
Humedad atmosférica	Sequedad atmosférica
Presencia de insectos detritívoros	Ausencia de insectos detritívoros
Heridas que permiten entrar en el organismo a bacterias e insectos	Ausencia de heridas
Superficie de la piel quemada	Piel carbonizada
Obesidad	Delgadez extrema
Septicemia premortem	No infecciones
Cuerpo expuesto al medio ambiente adverso (humedad, temperatura etc)	Enterramiento en tierra o inmersión en agua
Cuerpo tendido en el suelo	Cuerpo colgado
	Formación de adipocera
	Momificación

Tabla 1. Factores ambientales que aceleran o retrasan el proceso de descomposición cadavérica.

### INMERSIÓN EN AGUA

Los procesos de descomposición bajo el agua son la mitad de rápidos que en el aire, pues generalmente la temperatura es más baja y existe menos cantidad de oxígeno disponible por los microorganismos. También es importante tener en cuenta si se trata de agua dulce o salada, pues en esta última se permite el crecimiento de microorganismos halófilos. En el fondo marino, la descomposición puede llegar a ser muy prolongada, y generalmente son los peces y los invertebrados marinos los responsables de la misma, dejando a los microorganismos en un segundo plano. Los cuerpos que flotan pueden ser colonizados tanto por invertebrados como por microorganismos, que debido a la elevación de la temperatura y el oxígeno favorecen la descomposición.

### INFLUENCIA DEL SUELO EN EL APORTE DE MICROORGANISMOS

El suelo supone un reservorio de microorganismos de distintas procedencias, como los animales, vegetales o del propio suelo. El polvo generado por el viento arrastra una gran cantidad de microorganismos que colonizan cualquier materia orgánica inerte descomponiéndola. Algunos ejemplos de estos microorganismos, que tienen importancia en microbiología forense pertenecen a los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Escherichia*.

## **EFFECTO DE LAS QUEMADURAS EN LOS PROCESOS DE DESCOMPOSICION MICROBIANA**

En muchos casos, tras un accidente de avión o de tráfico los cuerpos aparecen quemados. Raramente en estos accidentes se suele alcanzar la temperatura de incineración (unos 1000 grados). En estos cuerpos aparecen factores que pueden aumentar o reducir la velocidad de descomposición, lo que hace difícil el poder generalizar. El calor por quemadura esteriliza la piel y deshidrata los tejidos, pues reduce la actividad de agua de los mismos, lo que dificulta el crecimiento de los microorganismos, aunque por otro lado, en la piel quemada aparecen escoriaciones que permiten la entrada de los mismos en la dermis o incluso en zonas más profundas facilitando la contaminación microbiana. De hecho, el problema más grave en quemados de segundo y tercer grado son las infecciones de los tejidos próximos a la zona quemada. Otro efecto es el producido en los cadáveres calcinados (Ávila, 1998).

Cuando en un accidente se produce una temperatura muy elevada, se puede llegar a producir la calcinación de forma total o parcial del cuerpo humano. Cuando la temperatura alcanzada es del orden de los 500 grados, se produce la destrucción por calcinación de los tejidos del cuerpo. Cuando la exposición al agente que produce el calor no es muy larga, generalmente se produce la calcinación de los tejidos más externos (piel, pelo y músculo) no llegando el proceso de calcinación a las vísceras, por lo que tras el fallecimiento, se produce la descomposición del interior del cadáver. Externamente los cadáveres carbonizados se caracterizan por tres factores:

- Deshidratación extrema.
- Caramelización de los tejidos.
- Destrucción completa de la materia orgánica.

Todos conocemos multitud de accidentes en los que se han producido una gran cantidad de fallecidos por calcinación, pero quizá el más célebre en España y el que más impacto causó en la sociedad amen de los accidentes aéreos fue el incidente que sucedió en el camping de los Alfaques en la localidad de Alcanar en Tarragona el 11 de julio de 1978. Eran la dos de la tarde, hacía calor y una buena parte de las personas tomaban un baño o estaban bajo una sombrilla. A pocos metros en la carretera circulaba un camión cisterna con 25 toneladas de propileno licuado. El camión volcó derramando el disolvente licuado, que con la temperatura estival se inflamó instantáneamente convirtiendo el camping en una bola de fuego. La explosión fue instantánea, y la temperatura puntual alcanzó los 1500 grados en pocos segundos. El resultado del accidente fue 243 fallecidos por calcinación o quemaduras de tercer grado y más de 300 heridos graves, con quemaduras para toda la vida.

## LOCALIZACION GEOGRÁFICA

La localización geográfica de un cadáver puede ser muy importante a la hora de poder determinar la data de la muerte mediante el proceso de descomposición o incluso poder determinar si ha habido traslado intencionado del cuerpo. Según la zona geográfica del mundo, el cadáver comienza a descomponerse a distinta velocidad:

ZONA TROPICAL → 24 horas (30-35°C) % Humedad 80-95%

ZONA TEMPLADA → 28-96 horas (10-25°C) % Humedad 50-75%

ZONA FRÍA → 96 horas > (0-10°C) % Humedad 20-50%

ZONA MUY FRÍA → Indefinido (< 0°C) % Humedad 5-20%

## INTERFERENCIAS MICROBIANAS EN LOS PROCESOS FORENSES

Algunas sustancias presentes en los tejidos de los animales o del hombre de forma natural pueden ser degradadas por los microorganismos tras la muerte. La mayor parte de estos productos son de tipo proteico que son transformados en aminos. La velocidad de degradación depende de muchos factores como el tipo de molécula o factores ambientales como la temperatura, el oxígeno, la actividad de agua, etc.

También se ha comprobado que estos microorganismos que degradan estas moléculas son capaces de incrementar el nivel de productos tóxicos (drogas) en los tejidos postmortem.

Es el caso del GHB (gamma hidroxí butirato), conocido como éxtasis líquido. Es un alucinógeno, desinhibidor sexual que produce la pérdida de recuerdos. Se encuentra en bajos niveles en el organismo humano proveniente de la metabolización del aminoácido GABA (gamma amino butirato) (Fig. 2).



**Figura 2. Transformación microbiana del ácido gamma amino butirato en ácido gamma hidroxí butirato (GHB).**

Algunos microorganismos son capaces de realizar este proceso de forma postmortem, como los géneros *Pseudomonas* y *Clostridium*. En algunas autopsias se han podido encontrar niveles muy elevados de GHB que daban a entender una muerte

violenta producida por la ingestión de estupefacientes. Un estudio microbiológico postmortem ha permitido identificar una infección sistémica producida por *Pseudomonas* que ha elevado los niveles de GHB por encima de 10.000 veces los niveles normales presentes en el organismo. Gracias al análisis microbiológico forense se pudo determinar la muerte por infección del individuo y que este no había ingerido ninguna sustancia prohibida.

### PERFILES DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.

La utilización de las nuevas técnicas moleculares ha permitido alcanzar niveles excelentes de identificación de microorganismos. Estas técnicas tienen una amplia repercusión en las técnicas de Microbiología Forense pues permite:

- Identificar poblaciones microbianas locales (saber si se ha trasladado un cadáver o no).
- Conocer el punto de origen de la muerte (asesinato, suicidio, etc...).
- Llegar a conocer al asesino (Polimorfismos de microorganismos o virus presentes en el mismo).

Las técnicas de identificación en Microbiología Forense son de dos tipos:

- **Técnicas que no utilizan ácidos nucleicos**

Estas técnicas se basan en los perfiles enzimáticos (isoenzimas) (Fig. 3), los perfiles de ácidos grasos presentes en la membrana plasmática bacteriana o los perfiles de asimilación o fermentación de azúcares.

Estas técnicas se unen a las técnicas clásicas de morfología y características metabólicas de los microorganismos. El problema que tienen es que requieren mucho tiempo en su realización.

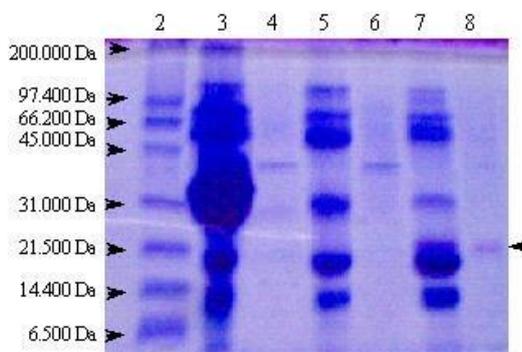


Figura 3. Identificación de microorganismos mediante análisis de perfiles enzimáticos.

- **Técnicas que emplean ácidos nucleicos**

Se basan en la identificación de secuencias específicas presentes en el genoma de los microorganismos. En la realización de estas técnicas se requiere:

- ✓ El aislamiento del material genético del microorganismo.
- ✓ La hibridación con una secuencia conocida (de los microorganismos esperados).
- ✓ Amplificación de la secuencia mediante la técnica de la PCR.
- ✓ Identificación de la banda deseada (y por tanto del microorganismo).

Las técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos son muy variadas y depende del nivel de identificación al que se quiera llegar se pueden aplicar unas u otras (Fig. 4).

Entre las distintas técnicas podemos encontrar:

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Microsatelite Primed PCR

tDNA PCR

RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

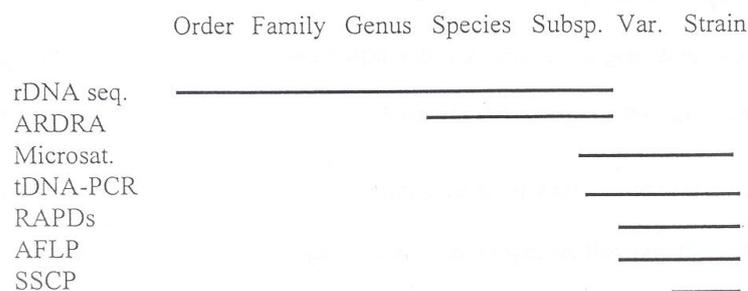
ARDRA (*Amplified Ribosomal Restriction Analysis*)

SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Hibridación de DNA-DNA *microarrays*

Secuenciación del DNA



**Figura 4. Especificidad de las técnicas moleculares en la identificación de microorganismos.**

Los perfiles de identificación de microorganismos tienen un interés crucial en Microbiología Forense pues permiten establecer el perfil microbiano de un suelo para poder ser utilizado como indicador forense (Jobling, 2004).

Para ello, se toman muestras de suelo de zonas determinadas, se determinan los microorganismos presentes en las mismas utilizando técnicas moleculares, y se incorporan a una base de datos. Tras un posible asesinato se toman muestras de suelo,

uñas, zapatos o piel y se contrastan con el perfil microbiano de los suelos pudiendo determinar así si ha habido proximidad o no a la zona del suceso. También estas técnicas de identificación permiten conocer las posibles modificaciones de la microbiota del suelo producida por la deposición de un cadáver.

Para realizar estos estudios, se han empleado cadáveres de voluntarios que se han colocado sobre distintos suelos (en los que previamente se había realizado el estudio de identificación del perfil microbiano) y se les ha dejado descomponer durante varios meses. Al cabo de este tiempo se realiza nuevamente el análisis de los microorganismos presentes en el suelo y se determinan las modificaciones que se han podido producir, bien por la descomposición y la incorporación de nuevos microorganismos propios del cadáver o bien, por la presencia de sustancias del cadáver que han permitido la modificación de las poblaciones del suelo.

### LOS PROTISTAS Y LOS HONGOS FILAMENTOSOS COMO INDICADORES FORENSES.

El reino Protista o Protoctista agrupa a organismos eucariotas microscópicos móviles o no con o sin clorofila. Algunos de ellos, ante condiciones adversas son capaces de formar estructuras de resistencia. Los hongos filamentosos son otro grupo de microorganismos, generalmente filamentosos, sin clorofila y en la mayor parte de los casos inmóviles. También son capaces de formar estructuras de resistencia que les permiten sobrevivir en condiciones adversas de extrema sequedad o frío. Estas características les permiten convertirse en bioindicadores forenses (Fig. 5).

MICROORGANISMOS	EVIDENCIA FORENSE
<p>Testamebas</p> 	<p>Localización geográfica Hábitat</p>
<p>Diatomeas</p> 	<p>Localización geográfica Hábitat Época del año Causa de la muerte <b>(ahogamiento)</b></p>
<p>Hongos filamentosos</p> 	<p>Localización geográfica Hábitat Época del año Envenenamiento Ingesta de drogas</p>

Figura 5. Microorganismos empleados como bioindicadores forenses.

De todos los protistas, las diatomeas o algas silíceas son las que más información aportan en los procesos forenses, pues se encuentran muy extendidas a lo largo de todos los hábitats, son muy sensibles a las condiciones de pH, temperatura y salinidad, lo que les hace muy específicas del punto en el que se ha podido producir un ahogamiento (Stoermer, 2001). En un capítulo de este libro se trata de forma exhaustiva este grupo de organismos mostrando la importancia de los mismos en los procesos de identificación de causas de muerte por ahogamiento o en el caso de producirse traslado de un cadáver post mortem.

Los hongos filamentosos también pueden ser utilizados como indicadores del intervalo en el que se ha podido producir la muerte de un individuo (Carter, 2003). Los datos que permiten obtener los hongos filamentosos se basan en las especies que pueden aparecer en la superficie del cadáver, su estado fisiológico (esporulado o vegetativo) y la velocidad de crecimiento en función de las características ambientales (temperatura y humedad). A continuación mostramos dos ejemplos de cómo pueden utilizarse estos microorganismos como material complementario a la hora de la reconstrucción de un proceso de muerte, bien natural o violenta, y como pueden ayudar a determinar la data del fallecimiento (Money, 2004). Hemos incluido dos casos reales que ejemplifican la importancia de este tipo de microorganismos.

### Caso 1

Se informa de la aparición de restos cadavéricos esqueletizados casi en su totalidad con algún resto de ropa el día 10 de noviembre de 2004 en una zona boscosa de Maryland USA. Muy cerca del cadáver, que aparece en el suelo se encuentra una cuerda colgada en una rama de un árbol a una altura de 2,8 metros. Se procedió a la toma de muestras de la superficie del cadáver empleando hisopos que se sembraron en los medios de cultivo para hongos filamentosos PDA ¼; MY20A con cloranfenicol 50 ppm.

Tras incubar durante 7 días a 25 grados realizando un seguimiento del crecimiento cada día, se encontraron los siguientes resultados: *Eurotium repens* (*Aspergillus repens* anamorfo) y de *Eurotium rubrum* (Fig. 6) en las partes blandas del cadáver y de *Eurotium chevalieri* y *Gliocladium* spp en los huesos. En principio se trata de hongos filamentosos propios de zonas boscosas, pero *Eurotium repens*, es una especie de hongo filamentoso que aparece sobre las ramas de los árboles y las hojas de los árboles.

Un estudio detallado mediante polimorfismos de las cepas aisladas de las partes blandas del cadáver, de la ropa y de la cuerda que colgaba del árbol permitió constatar que se trataba de la misma cepa, lo que indicaba que el cadáver estuvo colgado del árbol y posteriormente fue bajado del mismo y trasladado a la zona donde se encontró.

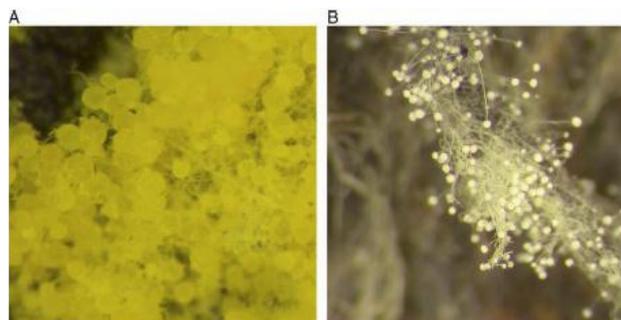


Figura 6. *Eurotium repens* (*Aspergillus repens* anamorfo) y de *Eurotium rubrum*.

## Caso 2

Individuo de raza japonesa que aparece muerto en un pozo de 6 metros de profundidad en el jardín de su casa. La casa del individuo se encuentra en la prefectura de Tochigi (Nor-oeste de Japón) (36.7°N, 139.7E) con una temperatura de la media 18°C, máxima de 27°C, mínima 8°C. El cadáver presenta politraumatismos, con rotura de fémures, cadera, cubito y radio de ambas manos, y la piel expuesta cubierta de hongos filamentosos. Se toman muestras de la superficie del cadáver empleando hisopos estériles, se siembran en los medios de cultivo específicos para hongos filamentosos PDA ¼ y MY20A con cloranfenicol 50 ppm. Se tomó la temperatura media del pozo donde se encontró el cadáver, y los hongos filamentosos se cultivaron a 25 grados (para la identificación de las especies) y a 10 grados para hacer un seguimiento del crecimiento en las condiciones del pozo.

Los resultados indicaron la presencia de *Aspergillus terreus* y *Penicillium* spp. Ambas especies en el estado inicial de esporulación, lo que indica que el individuo debió fallecer entre 10 y 12 días antes del momento en el que encontró el cadáver.

## PALEOMICROBIOLOGÍA FORENSE

La Paleomicrobiología forense es una parte de la Microbiología forense que estudia el diagnóstico retrospectivo de enfermedades infecciosas y parasitarias (producidas por protozoos) que aparecen en lesiones óseas o de tejidos momificados. Las técnicas que emplea la paleomicrobiología forense, son básicamente tres, la radiología, la microscopía electrónica y la biología molecular.

La paleomicrobiología forense no solamente puede considerarse una ciencia con interés histórico, sino que tiene un gran interés médico, pues el conocimiento de los microorganismos patógenos que se desarrollaron en la antigüedad puede permitirnos conocer la evolución de las enfermedades actuales, la evolución y virulencia de los microorganismos y la prevalencia de algunas enfermedades a través de la historia.

La detección de microorganismos empleando técnicas moleculares ha permitido establecer una correlación entre las lesiones observadas en huesos o tejidos momificados y las enfermedades que producen. De hecho, el genotipado de las cepas aisladas puede crear el puente entre la detección de los microorganismos de la antigüedad y las especies aisladas de muestras actuales.

La aplicación de técnicas de biología molecular en restos cadavéricos antiguos no puede realizarse siguiendo las técnicas que se aplican en la microbiología molecular forense clásica, pues el material genético ADN se aísla en unas condiciones totalmente distintas al de unos restos cadavéricos actuales. Así surge el concepto de “ADN antiguo”. El ADN antiguo se puede definir como en ADN extraído de un material orgánico que se sabe vivió antes del presente. La pregunta que inmediatamente podemos hacernos es ¿Qué edad debe tener el ADN antiguo? La respuesta es sencilla. No existe límite inferior para el ADN antiguo, considerándose el límite superior cincuenta años desde el fallecimiento (Aufderheide, 2003). Las muestras de ADN antiguo son muestras de ADN crítico, pues generalmente se tiene una baja cantidad de muestra de partida para la extracción del ADN, A lo largo del tiempo se han podido producir una serie de procesos que han ocasionado bien la degradación o bien la alteración de la muestra. El hecho de que las muestras normalmente hayan sido o bien enterradas o hayan sufrido algún proceso de transformación antropogénico (momificación) hace que tengan moléculas inhibitoras de los procesos de amplificación génica empleando la técnica de la PCR, e incluso que exista el problema de la contaminación cruzada de ADN (Fig. 7). Precisamente por las características de las muestras, el tipo de material del que se puede disponer es muy limitado, circunscribiéndose a huesos, dientes y tejidos deshidratados. Dependiendo del estado de conservación de los mismos y que hayan estado en contacto con tierra, agua o agentes conservantes como el formol, el ADN ha podido verse más o menos degradado (Thuesen, 1995).

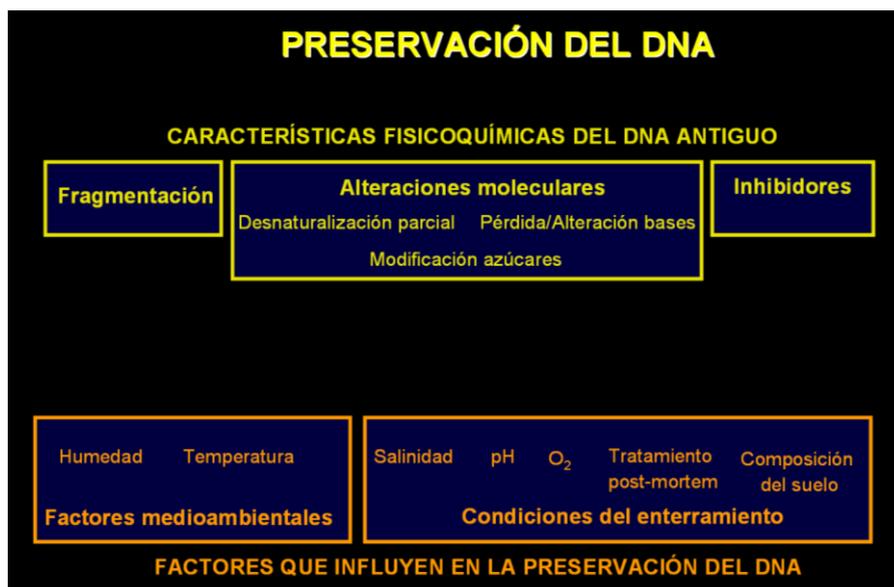
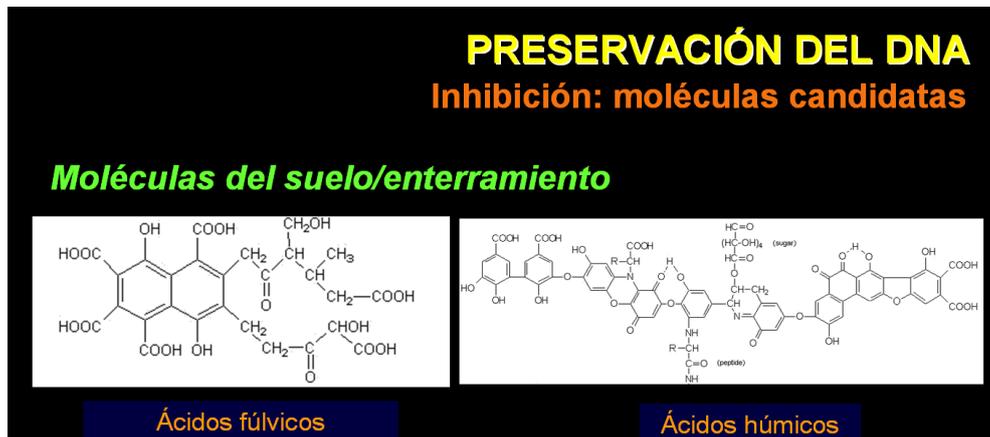


Figura 7. Factores que influyen en la conservación y alteración de los ácidos nucleicos en restos cadavéricos antiguos.

En el caso de los restos desenterrados, existen distintas moléculas presentes en los suelos que son capaces de interactuar con los ácidos nucleicos de forma covalente generando procesos de desnaturalización o modificación que incapacitan el empleo de las técnicas de PCR para realizar procesos de identificación. Entre las moléculas que interactúan con el ADN en el suelo se encuentran los ácidos fúlvicos, los ácidos húmicos, taninos, y metales pesados (Fig. 8).



**Figura 8. Moléculas que se encuentran en el suelo y pueden interactuar con los ácidos nucleicos de muestras cadavéricas inhibiendo los procesos de amplificación génica empleando técnicas de PCR.**

Otro problema importante es el de la contaminación cruzada del ADN antiguo con muestras de ADN actual. Este problema es muy complejo de resolver sobretodo con el ADN microbiano, pues el material a analizar (huesos o tejidos momificados) no suele estar en ambientes estériles y está sujeto a la contaminación microbiana del lugar donde se encuentren depositados los restos.

Por esta razón, es muy importante seleccionar el lugar de donde se va a tomar la muestra, realizar una limpieza exterior exhaustiva, y proceder a la extracción de la muestra si es posible del interior de los tejidos, de forma que la muestra haya sido protegida de los factores ambientales. Además de estas precauciones hay que realizar al menos tres extracciones de muestras que deben ser procesadas en tres laboratorios distintos y emplear controles tanto positivos como negativos.

Si en alguna de las muestras se detecta ADN exógeno (contaminante) hay que repetir el proceso de extracción hasta asegurarse la ausencia de contaminación actual (Fig. 9).

Gracias al desarrollo de estas técnicas, la paleomicrobiología forense ha permitido identificar patologías en restos blandos y óseos tales como: treponematosis, tuberculosis pulmonar y ósea, artritis tuberculosa y espondiloartritis, lepra, osteomielitis, artritis biogénica y enfermedades fúngicas como la blastomicosis y la coccidiomicosis. Cada día las técnicas de identificación y amplificación de ácidos nucleicos son cada vez más precisas y pueden llegar a permitirnos conocer más sobre

las enfermedades de la antigüedad y la su repercusión en la prevalencia de las mismas hoy en día (Ham, 2000).

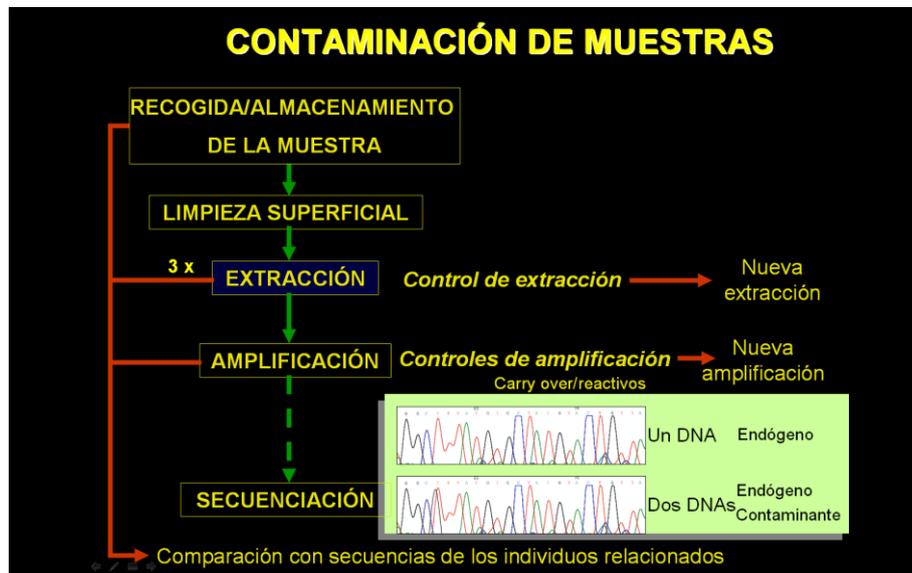


Figura 9. Protocolo de análisis de muestras para la caracterización de ADN antiguo.

## LA MICROBIOLOGÍA FORENSE EMPLEADA EN LA IDENTIFICACIÓN Y PREVENCIÓN DE ATAQUES BIOLÓGICOS

La utilización de microorganismos para la guerra es algo tan antiguo como la humanidad, ya los persas, griegos y romanos envenenaban los pozos de agua de sus enemigos arrojando cadáveres. Estos procedimientos también se emplearon en la conquista de norte América. En 1763 un general inglés Jeffrey Amherst regala dos mantas de un hospital con viruela a un jefe indio provocando la muerte de toda la población de indios Delaware. Procedimientos similares se emplearon durante la primera y la segunda guerra mundial. Incluso durante la guerra fría, rusos y norteamericanos fabricaron armas biológicas empleando microorganismos como el *Bacillus anthracis*, el virus de la viruela y otros microorganismos. El Protocolo de Ginebra de 1925 inició la regularización de las armas Biológicas, prohibiendo su utilización. En el año 1972 tuvo lugar la Convención sobre armas biológicas (CAB) que entró en vigor en el año 1975. Actualmente 150 países la han ratificado. En su artículo 1 la convención establece que: " Las partes de la convención se comprometen a nunca ni en ninguna forma desarrollar, producir, almacenar ni adquirir ó conseguir por cualquier medio agentes microbianos, otros agentes biológicos o toxinas que no estén justificados para fines sanitarios, de protección u otros de fin pacífico" (Barnaby, W. 2002). Sin embargo, la Convención no prohíbe expresamente la investigación sobre agentes biológicos potencialmente patógenos ni su aplicación o sus toxinas con fines pacíficos.

Todo esto ha abierto un gran debate sobre la aplicación real de la Convención sobre agentes biológicos. Los agentes biológicos (A.B.) llamados así en Microbiología forense pueden definirse como aquellos microorganismos o sus toxinas capaces de producir daño al ser humano, los animales, plantas o el medio ambiente en grado extremo.

A la hora de hablar de los agentes biológicos es necesario hablar del riesgo que estos suponen para los seres vivos. El CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) de Atlanta define el Riesgo Biológico como: La capacidad que tiene un agente biológico de producir un daño sobre los seres vivos. Este riesgo puede cuantificarse determinando la peligrosidad de los agentes biológicos clasificándolos en tres categorías (A, B y C) de forma que el riesgo más elevado se encuentra en los microorganismos del grupo A y el menor en el C.

- Agentes del grupo A: El *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, los virus hemorrágicos entre otros.
- Agentes del grupo B: *Brucella abortus*, *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella typhi*, *Coxiella burnetti*.
- Agentes del grupo C: Virus Nipah, Hantavirus.

De todos estos agentes biológicos, los más peligrosos pues producen una elevada mortalidad en la población a la vez que tienen un gran impacto en la salud pública provocando pánico se encuentran el *Bacillus anthracis*, agente productor del antrax y *Yersinia pestis*, agente causal de la peste pulmonar. Ambas enfermedades sin tratamiento adecuado pueden llegar a producir una mortalidad que oscila entre el 80 y el 100% de los infectados.

El objetivo de la utilización de agentes biológicos para la guerra consiste en la destrucción o sometimiento del adversario actuando directamente sobre el combatiente o sobre los medios de resistencia. Así las armas biológicas ofrecen ventajas tanto desde el plano estratégico como desde el táctico. Pudiendo emplearse en áreas urbanas, complejos industriales, puertos, nudos de comunicación ferroviaria o en objetivos logísticos, centros de transporte de tropas, asentamientos de artillería, etc.

La efectividad de las armas biológicas va a depender de distintos factores, como el agente biológico empleado, la peligrosidad y la forma de diseminación (fuerza explosiva, generadores de aerosoles, pulverizadores, empleo de vectores, etc.) todo ello vehiculado en proyectiles o diseminado directamente al medio ambiente mediante el empleo de aviones, bombas o misiles.

Además de los factores anteriormente indicados, existen ambientes especiales donde hay que tener en cuenta factores ambientales a la hora de desarrollar un ataque biológico, como son el desierto, donde las temperaturas extremas del día

reducen significativamente la viabilidad de los microorganismos o sus toxinas, la selva donde la lluvia, la humedad y las temperaturas altas aunque suponen unas circunstancias muy favorables para un ataque biológico se suelen ver dificultadas por la cubierta vegetal, que frena la llegada del agente biológico a tierra. Los terrenos montañosos y helados prolongan la vida de los agentes biológicos aunque las condiciones frías en general así como el viento modifican el transporte del agente (Tucker, J. 1992).

Tras un ataque biológico, las medidas a tomar son:

- Realizar la descontaminación de personas (empleando agua caliente y detergentes germicidas), limpiar a fondo uñas y vellosidades del cuerpo, quemar o lavar con agua hirviendo y jabón la ropa contaminada.
- En áreas exteriores, la luz ultravioleta tiene capacidad germicida y elimina una parte del agente biológico, además del empleo de lejía al 5% para limpiar superficies.
- En áreas interiores, debe aplicarse la limpieza de superficies con lejía, la descontaminación de personas con detergentes germicidas y la destrucción o limpieza de la ropa contaminada (Pearson, 1995).

El Instituto de Tecnología de Massachusetts, ha diseñado un microchip capaz de detectar agentes biológicos en armas. CANARY (Análisis Celular y Notificación de Riesgos y Producción de Antígenos) es un sistema híbrido que emplea un microchip en cuyas celdas existen linfocitos B modificados que reconocen multitud de antígenos de los microorganismos empleados en armas biológicas.

Cuando un microorganismo se pone en contacto con estos linfocitos B modificados se produce una reacción antígeno anticuerpo acoplada a la emisión de bioluminiscencia que es detectada por el chip, que mediante un pequeño ordenador identifica en menos de un minuto el agente biológico responsable del ataque.

Como hemos podido apreciar la Microbiología Forense no es una ciencia en sí, sino que teniendo como base la Microbiología clásica y molecular se interrelaciona con otras disciplinas como la Bioquímica, la Genética y la Paleontología.

El avance en los métodos analíticos de todas estas ramas del saber nos va a permitir en los próximos años tener un mayor conocimiento sobre los fenómenos que se producen en torno a la muerte, como poder llegar a conocer las causas de la misma y sobre todo conocer las causas que produjeron la muerte de nuestros antepasados. El futuro de la Microbiología Forense abrirá nuevas puertas hacia el conocimiento de nosotros mismos.

## BIBLIOGRAFIA

- Aufderheide, A. C. 2003. *The Scientific study of Mummies*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Avila, F. W. y Goff, M. L. 1998. Arthropod succession patterns onto burnt carrion in two contrasting habitats in the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences*, 43: 581-586.
- Barnaby, W. 2002. *Fabricantes de epidemias: El mundo secreto de la guerra biológica*. Siglo XXI de España. Madrid.
- Breeze, R. G.; Budowle, B. y Schutzer, S. E. 2005. *Microbial forensics*. London. Elsevier Academic Press.
- Campobasso, C. P.; Marchetti, D. y Introna, F. 2004. Postmortem artifacts made by ants and the effects of ant activity on decomposition rates. *Proceedings of the 2nd Meeting of the European Association for Forensic Entomology*. 29-30. London.
- Carter, D. O. y Tibbett, M. 2003. Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. *Journal of Forensic Sciences*, 48: 168-171.
- Dent, B. B., Forbes, S. L. y Stuard, B. H. 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, 45: 576-585.
- Di Maio, V. J. M. y Di Maio, D. D. 2001. *Forensic Pathology*. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fernández, I. 2008. Termobiología forense. *Aproximación criminalística a la data de la muerte*. Granada. Universidad de Granada
- Galloway, A. y Snodgrass, J. J. 1998. Biological and chemical hazards of forensic skeletal analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 43: 940-948.
- Ham, A. 2000. AFIP researchers' complete second critical gene sequence on deadly 1918 Spanish flu. *AFIP letter* 1598: 13-21.
- Jobling, M. A. y Gill, P. 2004. Encoded Evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews: Genetics*, 5: 739-752.
- Money, N. P. 2004. *Carpet monsters and killer Spores: A Natural History of Toxic mold*. Oxford. Oxford University Press.
- Pearson. G. 1995. *Chemical and Biological defense: An Essential National Security Requirement*. RUSI Journal 140: 4-24.

Shepherd, R. 2003. *Simpson's Forensic Medicine*. 12 ed. London

Stoermer, E. F. y Smol, J. P. 2001. *The Diatoms: Applications for the Earth and Environmental Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press.

Thuesen, I. Engberg, J. y Nielson, H. 1995. Ancient DNA from a very cold and a very hot place. In *Proceedings of the first World Congress on Mummy Studies*, February, 1992 Vol 1, pp 41-57 Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands: Archaeological and Ethnological Museum of Tenerife.

Tucker, J. 1992. The Future of Biological Warfare. In W Thomas Wander and Erick Arnett (comps). *The proliferation of Advanced Weaponry*, American Association for the Advancement of Science. pg 61.

### **BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA**

Livingstone, H.S. 1982. *The War Against Terrorism*, Lexington Books, Lexington M.A.

Tornados attack aircraft "built to spray anthrax". The Guardian, 19 de diciembre de 1998.

Recibido: 10 febrero 2012.

Aceptado: 2 octubre 2012.