
	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO P-DCF-ECT-BQM-14
	Versión: 12	Rige desde: 17/03/2023

Elaborado o modificado por: Dra. Gladys Nuñez Rivas Profesional en Genética Forense Sección de Bioquímica Dra. Rosahelena Mora Quiroz Profesional en Genética Forense Sección de Bioquímica MSc. Erick Esquivel Campos Profesional en Genética Forense Sección de Bioquímica	Revisado por Líder Técnico: Dra. Anayanci Rodríguez Quesada Profesional en Genética Forense Líder Técnico de Sección/Unidad de Bioquímica
Visto Bueno Encargado de Calidad: Dr. Manuel González Cordero Profesional en Genética Forense Encargado de Calidad de la Sección de Bioquímica	Aprobado por: Dra. Eugenia Fernández Mora Jefatura Sección de Bioquímica

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	05/09/2010	14/06/2014	Versión Inicial del Procedimiento	-	MEE
02	14/09/2014	30/10/2015	Revisión del PON	-	MEE
03	30/10/2015	30/09/2016	Revisión del PON	09-2015	EFM
04	30/09/2016	22/03/2017	Revisión del PON y cambio en formato	08-2016	EFM

	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA		PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO
	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA		P-DCF-ECT-BQM-14
Versión: 12		Rige desde: 17/03/2023	PAGINA: 2 de 10

05	22/03/2017	05/06/2017	Lista de chequeo	27-2017	EFM
06	05/06/2017	12/06/2018	Revisión y edición	50-2017	EFM
07	12/06/2018	01/08/2019	Revisión y edición	10-2018	EFM
08	01/08/2019	18/02/2021	Corrección de preparación y codificación de controles positivos	16-2019	EFM
09	18/02/2021	22/06/2021	Cambio Enzima Amilasa Salival	08-2021	EFM
10	22/06/2021	29/07/2021	Modificaciones posteriores a Auditoria Interna	20-2021	EFM
11	29/07/2021	17/03/2023	Reporte en SADCF	16-2023	EFM
12	17/03/2023		Edición y cambio de formato		

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 3 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

1 Objetivo:

El objetivo de este PON es realizar la prueba para la determinación de alfa amilasa humana, la cual se utiliza para la detección de saliva en casos forenses.

2 Alcance:

Este PON se emplea para determinar de forma confirmatoria la presencia de alfa amilasa humana en extractos realizados a partir de manchas de fluidos biológicos y de diversos indicios tales como colillas de cigarrillo, aplicadores tomados de diversos sitios anatómicos como región de mamas, región púbica, etc y de superficies inertes como vasos, botellas, etc. y a los cuales se les solicita investigación por saliva.

3 Referencias:

- Brozowski, A. M., D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, H. Bisgaard-Frantzen, A. Svendsen, T. V. Borchert, Z. Dauter, K. S. Wilson and G. J. Davies. 2000. Structural analysis of a chimeric bacterial α -amylases. High-resolution analysis of native and ligand complexes. *Biochemistry*. 39: 9099-9107.
- Coastal Healthcare. 1992. Bloodborne Pathogens. Virginia Beach, VA, USA.
- Gaensslen, R. E. 1983. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. National Institute of Justice.
- Molecular BioProducts. 2001. RNase and DNA Contamination effectively removed with application of RNase AWAY. Technical Report Number 205, San Diego California, USA
- Rodríguez-Sanoja Romina, Norma Oviedo and Sergio Sánchez. 2005. Microbial starch-binding domain. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 260-267.
- Serological Research Institute. Amylase diffusion. 1989. Richmond, California
- Independent Forensics. November 2016. Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID™- Saliva). Technical Information & Protocol Sheet for use with Dual Buffer System.
- Independent Forensics. 2007. Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID™- Saliva). Provided Protocols.
- Independent Forensics. Developmental Validation Studies of RSID™- Saliva Lateral Flow Immunochromatographic Strip test for the forensic detection of Saliva.
- Manual para desechos sólidos hospitalarios para personal médico y de enfermería, Programa Regional de Desechos Sólidos Hospitalarios, Convenio ALA 91/33 entre la Unión Europea y los Gobiernos Centroamericanos, 1998.

4 Equipos y Materiales:

- Agitador tipo Vortex o similar.
- Aplicadores de algodón estériles o similares.
- Bolsa de polietileno de alta densidad Fisherbrand, tamaño 8,5" x 11" o similar, para el descarte de material bioinfectioso.
- Cubrebocas desechables.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 4 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

- Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Determinación de Amilasa Salival: Sección de Bioquímica
- Formulario: Reporte para Bitácora Saliva.
- Gabacha blanca desechable
- Guantes desechables.
- Micropipeteadores de volúmenes ajustables.***
- Papel toalla desechable.
- Puntas para micropipeteadores de volúmenes ajustables*
- Recipientes de material plástico rígido (polietileno o polipropileno), impermeable y resistente a la perforación, golpes o caídas, provistos preferiblemente de un sistema que impida extraer los objetos desechados, preferiblemente de color rojo e identificados con una etiqueta visible con la palabra "punzocortantes" acompañada del símbolo de biopeligrosidad.
- Refrigerador con temperatura cercana a los 4 °C (rango aproximado de 2 a 8°C ± 2°C).
- Tijeras pequeñas de metal de punta fina.**
- Toallas suaves desechables "Kimwipes", marca Kimberly Clark o similar
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL nuevos y estériles tipo "Eppendorf" o similar.

*Ver: Procedimiento para la esterilización de material mediante autoclavado.

**Ver: [Procedimiento para el manejo de aplicadores, manchas de sangre y otros.](#)

***Limpie la parte externa de las micropipetas con DNA Away Cat 7010, luego con etanol al 70 % para eliminar los restos de DNA Away".

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

- Agua tipo Milli-Q o similar
- Control positivo (ver anexo 2)
- Control de reactivos Negativo (ver Anexo 2)
- Etanol al 70% grado comercial.
- Etanol al 95 % grado comercial.
- DNA Away Cat 7010 o similar
- Kit de RSID-saliva o similar para detección de amilasa salival humana.
 - Placa Inmunocromatográfica
 - Buffer (tampon) de extraction.
 - [Buffer \(tampon\) de corrida.](#)

6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento para realizar la pericia debe efectuarse en las áreas designadas de pre amplificación para el análisis de indicios para investigación por saliva en la Sección de Bioquímica.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 5 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

7 Procedimiento:

Nota 1: Se debe completar el Formulario: Lista de Verificación Procedimiento Determinación de Amilasa Salival: Sección de Bioquímica como verificación del seguimiento del procedimiento establecido.

Nota 2: Para la realización de este procedimiento es imprescindible el uso de cubrebocas y guantes desechables, esto para prevenir la contaminación de los indicios con saliva y/o sudor del analista.

7.1 Realización de los extractos.

7.1.1 Rotule un tubo de 1,5 mL con al menos el número de OT respectivo y el nombre del objeto (muestra) a analizar. Incluya un control positivo y control negativo por corrida.

7.1.2 Recorte un (os) trozo(s) de aplicadores, tela, colillas, etc para el análisis por saliva y coloque en los tubos rotulados, siguiendo lo establecido en el Procedimiento para el manejo de aplicadores, manchas de sangre y otros.

7.1.2.1 En el caso particular de las colillas, asegúrese de cortar un trozo del papel que cubra el filtro.

7.1.3 Agregue, utilizando una micropipeta, entre 100 y 500 µL de Buffer de extracción RSID- saliva, al tubo de microcentrifuga rotulado (el volumen necesario para cubrir por completo la muestra).

7.1.4 Agite con la ayuda del vortex y deje reposar los extractos según lo indicado en el inserto de información técnica del Kit (10 segundos a 1 hora).

7.2 Prueba confirmatoria

Nota 3: Cada vez que se cambie de lote de reactivos se debe verificar mediante el montaje del control positivo y el control negativo, previo al montaje de muestras de rutina.

7.2.1 Rotule con al menos el número de OT respectivo y el nombre del objeto (muestra) a analizar un tubo de microcentrifuga de 1,5ml. Agregue con una micropipeta 20 uL del extracto a analizar al tubo rotulado.

7.2.2 Agregue con una micropipeta a cada uno de los extractos y/o controles a analizar, 80 uL de buffer de corrida RSID-saliva para un volumen final de 100 uL y agite en vortex.

7.2.3 Rotule una placa de RSID-saliva como control positivo (CP-CPOS-Control Positivo-POS) y otra placa de prueba como control negativo (CN-CNEG-Control Negativo-NEG), por cada lote de muestras analizadas.

7.2.4 Adicione, con una micropipeta, 100 uL del extracto rotulado como control positivo (CP-CPOS-Control Positivo-POS) a la placa de RSID-saliva rotulada anteriormente. Descarte la punta en el recipiente para desechos punzocortantes.

7.2.5 Adicione, con una micropipeta, 100 uL del extracto rotulado como control negativo (CN-CNEG-Control Negativo-NEG), a la placa de RSID-saliva rotulada anteriormente. Descarte la punta en el recipiente para desechos biopeligrosos punzocortantes.

7.2.6 Adicione, con una micropipeta, 100 uL del extracto que va a analizar de cada una de las muestras a la placa de RSID-saliva rotulada al menos el número de OT

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 6 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

respectivo y el nombre del objeto (muestra) a analizar correspondiente. Descarte la punta en el recipiente para desechos biopeligrosos punzocortantes.

7.2.6.1 También puede utilizar las etiquetas impresas de código de barras único del SADCF para identificar las muestras respectivamente.

7.2.7 Una vez adicionado el volumen espere por 10 minutos y proceda a interpretar los resultados.

7.2.8 Lea la prueba e indique si es positiva, negativa o inválida según el criterio de interpretación siguiente:

- **Inválido:** No aparece ninguna línea o solo aparece línea en posición T (Falla la prueba, no se obtiene ninguna conclusión). La misma se debe de repetir utilizando una nueva placa.
- **Negativo:** sólo presenta línea en posición C. No se detecta alfa amilasa humana.
- **Positivo:** aparece una línea en posición C y otra en posición T. Se detecta alfa amilasa humana.

Nota 4: Todos los resultados obtenidos deben ser verificados. Este proceso se debe realizar según lo estipulado en el PON de Gestión de Casos e Interpretación de Resultados.

7.2.9 Anote los resultados obtenidos para la muestra analizada en el Formulario: "Reporte para Bitácora Saliva" del (os) caso (s) realizando un *check* en la casilla correspondiente del formulario. De la misma manera puede realizar el reporte de resultados en el SADCF utilizando la funcionalidad "Registro de Análisis en Serie" (Ver manual de uso del SADCF).

7.2.10 Anote el número de Lote y la fecha de vencimiento del Kit de RSID-saliva utilizado en el Formulario: "Reporte para Bitácora Saliva" y/o en el Formulario Lista de Verificación Procedimiento Determinación de Amilasa Salival: Sección de Bioquímica donde corresponda.

7.2.11 Proceda a descartar la placa de prueba RSID-saliva en bolsas de polietileno de alta densidad para descarte de material biopeligroso.

7.2.12 Limpie cuidadosamente la mesa de trabajo con etanol al 70% y/o DNA Away, utilizando toallas de papel desechables, sobre todo en aquellas áreas que han estado en contacto con material biológico.

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

- El límite de detección usado con este procedimiento es de 10 nL de saliva humana indicado de acuerdo a la información suministrada por la casa comercial en el panfleto.
- De acuerdo a la literatura científica actualizada relacionada a la aplicación del kit RSID para la determinación de amilasa salival, se pueden presentar reacciones cruzadas o interferencia en el resultado de la prueba cuando: los objetos analizados presentan más de un fluido biológico, como por ejemplo, semen puro o mezclas de semen con otro fluido como sangre, la presencia de sudor, orina, secreción ó fluido vaginal, leche materna, materia fecal.
- No existe reacción cruzada con amilasa salival de otras especies como: perro, zorro, hámster, vaca, gato doméstico, conejo doméstico, gecko, mangosta, camaleón, cerdo doméstico, llama, oveja, caballo, cabra, león, tigre, rinoceronte, mono capuchino entre otros, de acuerdo a la información suministrada por la casa comercial.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 7 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

- Pruebas confirmatorias por RSID-saliva: Se rechaza el resultado si no se observa la banda de control interna, o sea, una banda de color rosado en el área identificada como "C" en la placa de prueba RSID-saliva de análisis del Kit durante el análisis de las muestras o los controles.
- Pruebas confirmatorias por RSID-saliva: No continúe los análisis si los controles positivo y negativo no dan los siguientes resultados: el control positivo debe dar un resultado positivo que presenta dos líneas rosadas una en el área de prueba T y otra en el área de control C en la placa de análisis del Kit e indica que hay saliva humana presente. El control negativo debe dar un resultado negativo, tiene una sola raya rosada en el área de control C en la placa de análisis del Kit (Ver figura 1).

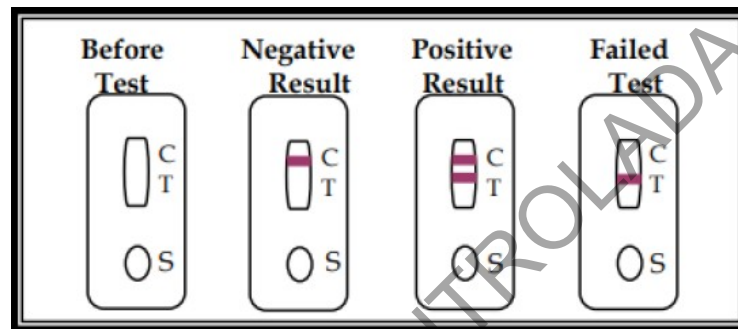


Fig1. Interpretación de resultados esperados en kit RSID-saliva

8.1 Acciones Correctivas:

- Si no se observa la banda de control interna, o sea, una banda de color rosado en el área identificada como "C" en la placa de análisis del Kit RSID-saliva repita la prueba usando otra placa. Si el problema persiste repita la prueba con un nuevo lote del Kit RSID-saliva e informe al Líder Técnico y al encargado de Calidad de la Sección la situación presentada.
- En caso de que los controles no den los resultados esperados (ver punto 8), proceda a repetir la prueba con controles nuevos y/o con un nuevo kit RSID-saliva de reactivos e informe al Líder Técnico y al encargado de Calidad de la Sección la situación presentada.
- Si el indicio que se solicita analizar por la presencia de amilasa salival está positivo por sangre o semen (prioritarios), no se realizará el montaje de la prueba de determinación de amilasa, esto por la posibilidad ya documentada de que se presente una reacción cruzada o resultado positivo falso y por tanto se reporte un resultado incorrecto, lo anterior de acuerdo a la literatura científica actualizada.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

- N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

- Se debe realizar el reporte de resultados y la interpretación de los mismos de acuerdo a lo estipulado en el SADCF.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 8 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Recuerde colocarse la gabacha, cubrebocas y los guantes antes de manipular las muestras, ya que los fluidos biológicos son fuente potencial de enfermedades por lo que debe manipularse según normas establecidas.
- Proceda a limpiar la mesa de trabajo con etanol de 70% y/o DNA Away, utilizando toallas de papel desechables, antes y al final de los análisis, sobre todo en aquellas áreas que han estado en contacto con material biológico.

12 Simbología:

- BQM: Bioquímica
- DCF: Departamento de Ciencias Forenses
- FTA: (*Flinders Technology Associates*). Tarjetas para recolección, estabilización, procesamiento, transporte y archivo de muestras biológicas.
- mL: Mililitros
- N/A: No Aplica
- nl: nanolitros
- OT: Orden de trabajo.
- PON: Procedimiento de Operación Normado.
- RSID: *Rapid Stain Identification of Human Saliva*
- SCD: Solicitud de Cambio Documental
- ul: microlitros

13 Terminología:

Desechos punzocortantes: El desecho punzocortante es todo objeto metálico, plástico y de cristal, con capacidad de penetrar y/o cortar tejidos humanos, facilitando el desarrollo de infección. Estos son: todo tipo de agujas, hojas de bisturí, navajas, materiales rígidos como tubos de ensayo de vidrio y de plástico, puntas plásticas de micropipetas, todo tipo de jeringas, porta y cubre objetos, aplicadores, asas de microbiología, lancetas, placas de petri, pipetas pasteur, brocas, grapas, otros instrumentos metálicos con filo y punta, etc., que hayan estado en contacto con agentes infecciosos o sus fuentes.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos
02	Preparación de controles

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 9 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

Anexo No. 1
Preparación de reactivos

Etanol al 70%

Agregue 735 mL de etanol al 95% grado comercial medidos en una probeta estéril y afofe con agua destilada tipo Mili-Q o similar estéril a 1 L en un balón aforado estéril. Guarde en botella de vidrio estéril y almacene a temperatura ambiente hasta que la solución no presente turbidez.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 12	PAGINA: 10 de 10
PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA HUMANA	P-DCF-ECT-BQM-14	

Anexo No. 2
Preparación de controles

Control positivo

Impregne saliva humana de un(a) donador(a) que no participe en análisis en una tarjeta FTA, rotule como control positivo y seque a temperatura ambiente en la cámara de secado Air Clean Systems. Una vez seco, recorte círculos de 2 ó 3 mm² con el minisacabocados limpio o con tijeras de metal también limpias. Guarde en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL tipo "eppendorf" o similar rotulado como control positivo. Este control se debe almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración. La preparación de estos controles se deberá registrar en el "Formulario para Reactivos Preparados".

Control negativo

Utilice un blanco de reactivos como control negativo.

COPIA NO CONTROLADA