



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“Pruebas Químicas de Saliva en la Detección de
Amilasa Salival en la Investigación de un Delito”**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

“DIPLOMADO DE QUÍMICA LEGAL”

CARRERA: Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA

Cid Mejía Jabier

CUENTA: 40509800

ASESOR DE TESINA

Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López



MÉXICO, D.F. FEBRERO 2014

I.	Introducción.....	3
	A. Antecedentes.....	3
	B. Composición de los fluidos corporales.....	3
	C. Sangre.....	3
	D. Semen.....	4
	E. Saliva.....	4
	F. Búsqueda de muestras de saliva.....	6
	G. recomendaciones para la recolección de muestras de saliva.....	8
	H. Recolección de muestras de saliva.....	10
	I. Empaquetado de las muestras de saliva en sobres o bolsas de papel.....	12
	J. Objetivos de la recolección de muestras de saliva.....	13
	K. Conservación de las muestras de saliva.....	13
	L. Precauciones para evitar la contaminación de las muestras.....	14
	M. Cadena de custodia para la evidencia que se va al laboratorio forense.....	15
II.	Planteamiento del problema.....	17
III.	objetivos.....	18
	General.....	18
	Particular.....	18
IV.	Metodología.....	19
V.	Resultados.....	20
VI.	Análisis de resultados.....	28
VII.	Conclusiones.....	30
VIII.	Anexos.....	31
IX.	Referencias.....	36

I. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES

Los fluidos corporales que se encuentran en la escena de un supuesto crimen, son de gran envergadura para un investigador forense, éstos pueden ser: sangre, semen, saliva, fluidos vaginales, orina, sudor, lagrimas etc. todos ellos son trascendentes para identificar a la presunta víctima, al agresor, o incluso exonerar a un individuo de un delito que no ha cometido, la mayoría de los fluidos encontrados contienen indicio valioso de ADN. Las pruebas de detección de manchas desconocidas se lleva a cabo cuando existen cantidades muy pequeñas debido a que tienden a degradarse en condiciones ambientales, de ahí que el investigador forense debe escoger un método para identificar un fluido en específico ya que unos llegan a ser invisibles a simple vista (por ejemplo manchas de saliva).

Cada tipo de fluido encontrado en la escena de un crimen tiene un método de detección que puede ser de naturaleza presuntiva o confirmativa. El problema con la mayoría de las pruebas, es la destrucción de las muestras, de aquí la importancia de la selección del método para identificar el tipo de fluido sin tener que destruirla, y realizar otros análisis diferentes, por ejemplo las pruebas de identificación genética, ya que es de vital importancia y puede ser decisivo en un caso, muchas de las técnicas utilizadas han existido por mucho tiempo y han ido evolucionando, así como, nuevas técnicas actuales basados en marcadores moleculares y genéticos como el ADN y RNA

B. COMPOSICIÓN DE LOS FLUIDOS CORPORALES

Los fluidos corporales tienen composiciones similares y se diferencian por ciertas características únicas que las hacen diferentes de otros fluidos, y es la base para poderlos identificar, la diferencia será la prueba que se le realice para un componente en específico que se diferencie de los demás tipos de fluidos, así la amilasa se encuentra en grandes cantidades en la saliva, comparado con cantidades muy pequeñas en semen u otro fluido, la urea en la orina y sudor.

C. SANGRE

La sangre es el fluido que se encuentra comúnmente en mayor abundancia en la escena donde se ha perpetrado un supuesto delito, la identificación de manchas de sangre se puede realizar de dos maneras: como pruebas presuntivas o como pruebas confirmatorias; las pruebas más comunes de tipo presuntivas que los investigadores utilizan son: técnicas de identificación de manchas de sangre con

luz ultravioleta (UV), métodos catalíticos, métodos cromatograficos etc. ejemplo la prueba de la fenolftaleína.

Las pruebas confirmativas, algunas son ópticas; como el microscopio, para identificar morfología de células, también se utiliza el Microscopio Electrónico de Barrido, así como pruebas de formación de cristales, ejemplo la prueba de Teichman o Takayama. Métodos espectroscópicos como son: UV-vis, prueba de Fluorescencia de hematoporfirina por excitación con luz UV, reacción cruzada de la hemoglobina con hemoglobina anti-humana, técnica de análisis con izoenzimas y por ultimo por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). Por métodos cromatograficos como puede ser la Cromatografía en capa fina.

Algunas técnicas actuales en desarrollo como la de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

D. SEMEN

El semen es otro de los fluidos que comúnmente se encuentra en la escena de un crimen, principalmente en aquellos que sean de origen sexual, cuenta también con numerosas pruebas tanto presuntivas como confirmativas.

Las técnicas presuntivas para la identificación de manchas de semen se utiliza luz ultravioleta (UV), métodos espectroscópicos, cromatograficos e inmunológicos ejemplos: la prueba de la Mancha del Árbol de Navidad, inmunoensayo de capa fina (TIA) y La Prueba para la Fosfatasa Acida Seminal (SAP), esta última es la prueba más utilizada por el investigador forense.

Las técnicas emergentes para identificación de manchas de semen, se están desarrollando y perfeccionando al igual que con los de sangre, una de estas es la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) específico para genes que hay en cantidades suficientes en el semen, como es la Protamina 1 y 2 (PRM1) (PRM2)¹.

E. SALIVA

Además de la sangre y el semen, la saliva es otro de los fluidos que se encuentran comúnmente en la escena de un crimen, y a pesar de que existen muy pocas técnicas y métodos de identificación de saliva, conocidos y aceptados en la comunidad forense. Los métodos conocidos son presuntivos y no existen métodos o técnicas de confirmación que sean específicos para saliva.

La identificación de saliva es importante para entender los detalles de un crimen, por ejemplo, la identificación de la saliva de un sospechoso que deja en la piel de la víctima proporciona evidencia de la agresión que sufrió. El ADN del

sospechoso puede ser obtenido de la saliva confirmando la identidad de este. La mayoría de las técnicas y métodos de identificación de saliva se basan en la detección de manchas en filtros de cigarrillos, sellos, gomas de mascar, prendas, mordidas en la piel de la víctima o bien en objetos como son: vasos, copas, botellas, palillos etcéteras en donde se identifica principalmente a la α -amilasa.²

Como la sangre y el semen, las manchas de saliva se pueden detectar con una fuente de radiación electromagnética en donde las manchas de saliva aparecerán de un color blanquiazul cuando se observa bajo una luz UV.

Las técnicas y métodos más populares y ampliamente aceptados para la identificación de saliva, se basan en un identificador de la actividad de la amilasa. La amilasa salival es codificada por el gen AMY1 que es el responsable de la síntesis de la amilasa. El AMY1 se encuentra más en saliva que en cualquier otro fluido, considerándose como una identificación presuntiva de saliva.³

La identificación de saliva se considera una prueba no invasiva por lo cual los investigadores forenses han puesto especial interés, en técnicas y métodos que permitan realizar su identificación y que dan resultados positivos en un periodo de tiempo muy breve (ejemplo existe métodos químicos que dan resultados en tan solo 5 minutos), también la saliva es útil para identificar ciertas enfermedades, infecciones víricas, presencia de medicamentos, como los medicamentos ilícitos drogas de abuso, etcétera.⁴

Con el descubrimiento de la alfa amilasa se desarrollaron y validaron métodos para identificar saliva humana, aun en estos días los métodos para identificar α -amilasa han cambiado muy poco. Los métodos para identificar amilasa se basan en la actividad que posee y los resultados positivos obtenidos se basan con la cantidad de α -amilasa presente independientemente del organismo que proviene.

La prueba del almidón-yodo se fundamenta el hecho de que el almidón reacciona con el yodo formando un complejo de color azul, al entrar en contacto con la amilasa salival reacciona con el almidón liberando al yodo, perdiendo gradualmente el color, sin embargo esta prueba puede dar falsos positivos si existe amilasa proveniente de otra fuente.⁵

La prueba del reactivo de Phadebas® incluye una porción de red de amilopectina, ha sido aplicado en tubos de prueba pudiendo detectar saliva diluida hasta 1:128

Otro método útil, utiliza un complejo insoluble de colorante-amilasa llamado Amylose Azure como un sustrato que produce un cambio de color después de la hidrólisis de la amilasa. Esta técnica es más sensible y puede detectar diluciones

de saliva tan baja como 1:1000, y requiere menos tiempo de incubación, puede detectar saliva presente en una mezcla de fluidos corporales.

La técnica Rapignost®-Amylase, son tiras comerciales, detectan amilasa en orina y también ha sido aplicado a manchas de saliva. Esta prueba es simple y solo requiere de un tiempo de reacción de 30 min.⁶

Los métodos y técnicas en desarrollo actualmente para detectar saliva, se basan en marcadores genéticos, especialmente al mRNA y pueden ser consideradas como pruebas confirmatorias, pero que aún están en proceso de validación.

Otra técnica de identificación es SALIgAE®, se encuentra disponible en tiras y en nebulizaciones, es menos sensible que las pruebas de Phadebas® y Almidón-iodo solo detecta diluciones de 1:10 en aproximadamente 10 min.

La técnica RSDI-saliva test, es un anticuerpo monoclonal móvil y estacionario de α -amilasa salival y anti-humano que se forma una línea rosa en presencia del antígeno. Detecta saliva diluida de hasta 1:10,000

Otro método utilizado es espectroscopia de fluorescencia, es útil para detectar manchas secas.⁷

F. BUSQUEDA DE MANCHAS DE SALIVA

Con pequeñas cantidades de células son suficientes para obtener información genética útil para ayudar en resolución de un caso, la saliva también es una fuente importante de material genético y contiene células en cantidades suficientes para realizar una prueba de ADN en el laboratorio forense. Un aspecto importante para el investigador es la observación, si a primera instancia no se ve una mancha, no significa que no hay suficientes células para el análisis del ADN. Además, el ADN hace algo más que identificar el origen de la muestra, sino que puede identificar si una persona conocida pudo estar en la escena del delito, en una casa o en una habitación donde el sospechoso afirma no haber estado. Se puede refutar la reclamación de la defensa y poner en la escena al sospechoso, así de esta manera, se puede cambiar la historia de una coartada, para la de una de consentimiento. Las manchas de saliva no se pueden ver a simple vista, sin embargo existen indicios que pueden contener trazas de saliva ejemplos: colillas de cigarros, gomas de mascar, palillos de dientes, estampas o sobres, botellas, latas de refresco, vasos o copas, en mordidas etcetera, y contienen cantidades suficientes de material biológico para un análisis de ADN.⁸



Fig. 1 Colillas de cigarro, donde generalmente hay suficiente saliva para un análisis forense. (Tomado de http://www.ncfs.org/bio_evd.htm)

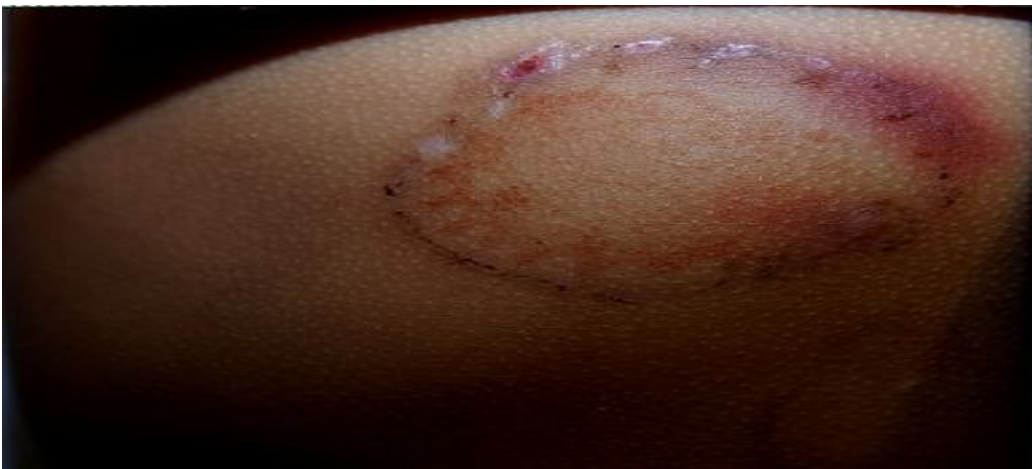


Fig.2 En la víctimas de agresión sexual, generalmente se encuentra cantidades suficientes de saliva para el análisis de ADN. (Tomado de <http://www.abfo.org/>)



Fig. 3 Otra fuente importante de donde se obtienen cantidades suficientes de saliva e incluso de huellas dactilares es en copas o vasos para identificar al posible sospechoso. (Tomado de <http://cofse.org/>)



Fig. 4 otra manera de obtener saliva para pruebas de ADN es limpiando la cavidad bucal (National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice, A Simplified Guide To DNA Evidence. 7881 114th Avenue North Largo, Florida 33773; 2013)

G. RECOMENDACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA

- Manipular mínimamente la muestra de saliva. Si se sospecha de que la mancha está en un objeto que pueda ser enviado al laboratorio, esto facilita el procedimiento de recolección de muestra. Y Si la mancha se encuentra en una superficie lisa no porosa, será más fácil la recolección de la muestra en el mismo lugar y evitar el contacto con otros objetos que puedan contaminarlo.
- Si la mancha se encuentra en una superficie porosa de gran tamaño (por ejemplo madera o alfombra). El área donde se encuentra la mancha puede ser cortado y envasado en una bolsa de papel. Asegúrese de cortar una porción del material sin mancha para el control
- Si no es posible el transporte del objeto o cortar la superficie donde se encuentre la mancha de saliva, utilizar hisopos de algodón humedecido con solución salina estéril, concentrando al máximo la saliva en el hisopo. Tomar una muestra control utilizando el mismo procedimiento con el hisopo cerca de donde se encontraba la mancha. Dejar que se sequen al aire, después empaquetar las muestras en bolsas de papel o sobres llamados "Bindles".⁹ (Anexo 1)

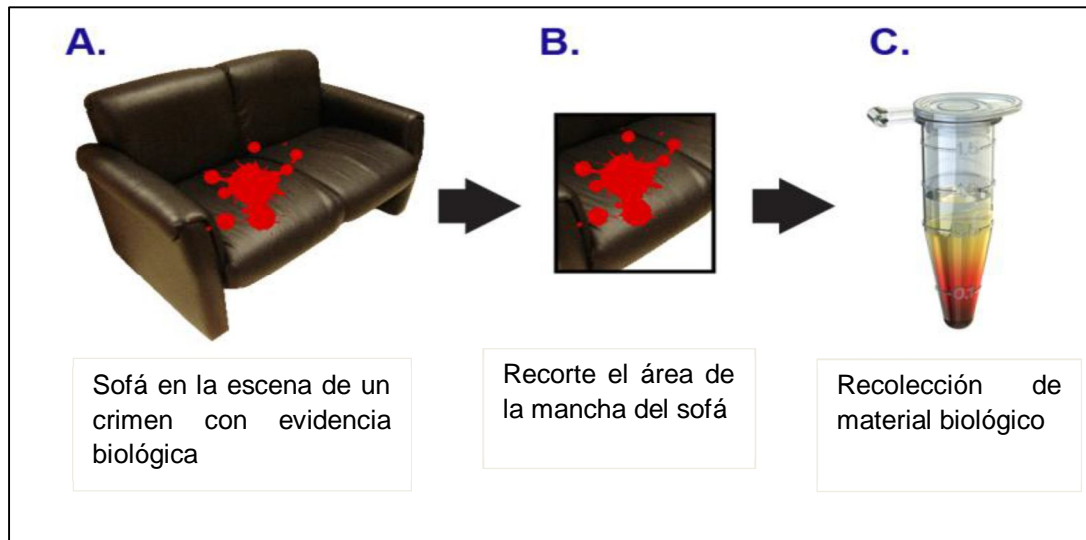


Fig. 5. Recolección de la evidencia biológica en objetos grandes (Ballou S, Bamberger PS, Brown L, Brown R, Burney I, Davenport D et al. The Biological Evidence Preservation Handbook, Best Practices for Evidence Handlers. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice. 2013)

- El tamaño de la mancha, será proporcional a la cantidad utilizada del sustrato para su recolección. Por lo tanto, utilizar solo una pequeña parte del hisopo para recoger la pequeña mancha. Evite extender la mancha en una superficie mayor
- Para manchas muy pequeñas (por ejemplo del tamaño de 2 mm) el investigador forense debe de tener la pericia necesaria para la recogida de muestra
- Cambiarse los guantes para empezar a recoger manchas muy pequeñas de saliva
- Si la mancha se encuentra en un objeto demasiado grande y no se puede enviar al laboratorio es preferible utilizar hisopos y herramientas adicionales para cortar la parte donde se encuentre la mancha sospechosa (por ejemplo, navajas nuevas, pizas nuevas de preferencia esterilizadas figura 6)
- Realice el procedimiento lo más rápido posible, evitando mantener la muestra húmeda por demasiado tiempo. Secar al aire libre toda la muestra húmeda lo más pronto posible. No lo exponga al calor o a la luz solar en un intento de secar rápidamente la muestra.¹⁰

H. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA

La preservación y el mantenimiento de los indicios encontrados son fundamentales. La clave es entender la evidencia y la comprensión de la forma correcta de manipularlo.

Al buscar indicios de saliva en la escena de un delito, puede encontrarse en forma de manchas secas o frescas, en objetos pequeños que es posible transportar al laboratorio forense o en objetos grandes que es imposible su traslado.

Si las manchas se encuentran en objetos pequeños, como por ejemplo: en colillas de cigarro, copas o vasos de vidrio, gomas de mascar, sobres, etcétera, proceder a empaquetar y colocar las leyendas de identificación correspondientes siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.

En cambio, sí es en objetos grandes (ejemplo en sillones, asientos de carros etcétera), se procede a delimitar el área en donde se encuentra las manchas de saliva y cortarlo, embalarlo e identificarlo para enviarlo al laboratorio para pruebas adicionales (figura 5).¹¹

También existirán casos en donde se encontrarán manchas de saliva en la víctima (ejemplo: mordeduras en víctimas de agresión sexual). Si este es el caso proceder de la siguiente manera: utilizar dos hisopos, uno humedecido con una o dos gotas de solución salina estéril y el otro seco. Con el hisopo húmedo frotar la parte sospechosa donde se encuentra la mancha de saliva y se continúa con el hisopo seco para recoger todo el indicio posible. A continuación los hisopos se secan a temperatura ambiente y se etiquetan por separado como hisopos secos y húmedos, empaquetarlos de preferencia en sobres de papel para enviarlos a laboratorio para más pruebas adicionales (figura 7).

Los datos que deben de contener el empaque como mínimo son: tipo de muestra, fecha, iniciales del investigador, nombre y número del caso, lugar de donde procede la muestra^{12,13}



Fig. 6. Obtención de indicios de saliva con escalpelo y pinzas. (Ballou S, Bamberger PS, Brown L, Brown R, Burney I, Davenport D et al. The Biological Evidence Preservation Handbook, Best Practices for Evidence Handlers. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice. 2013)

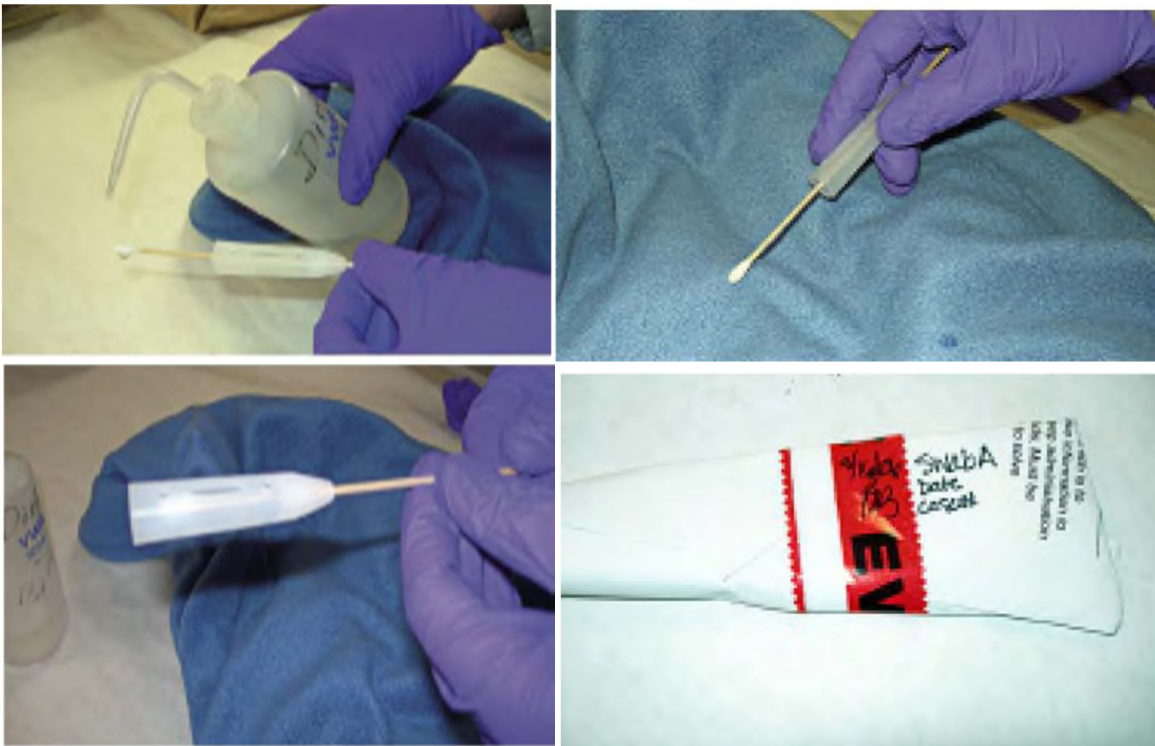


Fig. 7. Para la recolección de manchas de saliva utilizar un hisopo y humedecerlo con una o dos gotas de solución salina estéril (a), después frotar sobre el área donde se encuentre la mancha de saliva (b) una vez recolectada la muestra, proteger al hisopo (c) por ultimo empaquetar la evidencia recolectada con los datos correspondientes. (State of Montana Department of Justice, Forensic Science Division. Evidence Handling Manual, Montana State Crime Lab. 2679 Palmer Missoula, Montana 59808; 2013)

I. EMPAQUETADO DE LAS MUESTRAS DE SALIVA EN SOBRES O BOLSAS DE PAPEL.

- Dejar que las manchas o hisopos se sequen al aire tanto como sea posible antes de colocarlo en un sobre o en una bolsa de papel.
- Empaquetar el control (la muestra sin mancha) por separado de la evidencia de la mancha de saliva.
- Empaquetar separadamente toda la evidencia en bolsas o sobres de papel.
- Asegurarse que la bolsa o sobre de papel es lo suficientemente grande como para permitir la circulación de aire alrededor de la evidencia.
- Poner las muestras en bolsas de papel evitar que haya contaminación entre diferentes muestras.
- Poner Masking tape, iniciales y la fecha a todos los paquetes¹⁴

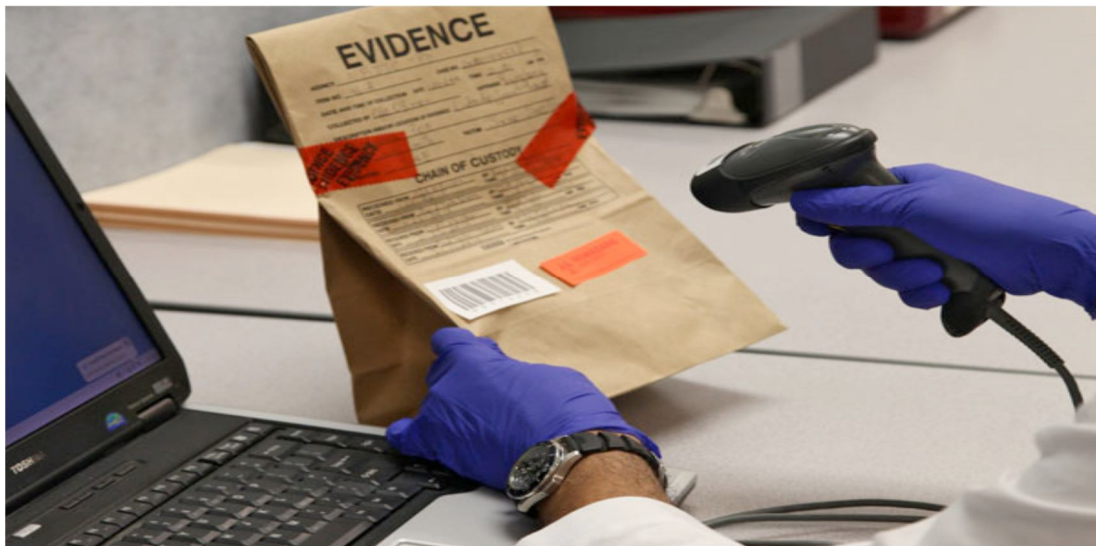


Fig. 8. Empaquetando la muestra correctamente en una bolsa de papel (National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice, A Simplified Guide To DNA Evidence. 7881 114th Avenue North Largo, Florida 33773; 2013)

J. OBJETIVO DE LA RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

- Recoger la mayor cantidad de muestra, si es posible de una misma fuente.
- Concentrar al máximo la muestra de la mancha de saliva recolectando con una mínima cantidad del sustrato.
- Evitar que la muestra de saliva obtenida se contamine.
- Cambiarse de guantes si existe la sospecha de que pueda contaminar la muestra.
- Se debe de utilizar cubre bocas y evitar hablar a fin de proteger la muestra.
- Evite el deterioro de la muestra, siguiendo los protocolos del manejo de las muestras.
- Proteger la muestra de las condiciones ambientales, por ejemplo si es saliva fresca, recolectarlo inmediatamente y empaquetarlo en un mínimo de tiempo.¹⁵

K. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

Si la evidencia recolectada está seca, el investigador debe de verificar los datos de la identificación de la muestra y colocarlos en recipientes debidamente identificados ya sea en bolsas de papel o en recipientes donde la muestra no se vea afectada. El tamaño y el tipo de contenedor va depender de la evidencia biológica. En general la bolsa o el contenedor deben estar bien sellados para asegurar que no se perderá ninguna prueba. Algunos contenedores vienen con sellos del fabricante que no requiere de una cinta selladora. Todos los contenedores deben indicar el nivel de riesgo biológico el que se esté almacenando.

- Cada contenedor deberá etiquetarse con información esencial para el procesamiento eficiente de datos, archivo y recuperación.

- Debido a que las pruebas se pueden necesitar nuevamente deben ser almacenados individualmente, se debe de estandarizar un proceso de almacenamiento que facilite su búsqueda.



Fig. 9 Evidencia almacenada en bolsas (a) y unidad de secado de muestras (b) (Ballou S, Bamberger PS, Brown L, Brown R, Burney I, Davenport D et al. The Biological Evidence Preservation Handbook, Best Practices for Evidence Handlers. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice. 2013

La estabilidad del manejo de las manchas de los fluidos corporales debe de realizarse con métodos que garanticen su fiabilidad científica y si no se almacenan y tratan adecuadamente pueden ser objetos de impugnación.

Para la conservación y almacenamiento de las muestras de manchas de saliva en estudios realizados han demostrado que si se protegen de la luz del sol y de las condiciones ambientales, las muestras pueden almacenarse por largos periodos sin que se vean afectados en la realización de pruebas de ADN, es decir, las condiciones de almacenamiento ideal oscila a temperaturas de 2°C-8°C en solución salina esteril.^{16, 17}

L. PRECAUCIONES PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

- Para evitar que la muestra se contamine, no permitir que la evidencia entre en contacto con otras muestras de manchas de fluidos biológicos, minimice el contacto con la muestra, no hablar sobre la muestra de saliva, utilizar cubre bocas.

- Cada mancha de saliva encontrada en la escena del delito debe ser recolectada individualmente, no recolectar o empaquetar juntos dos manchas de saliva.
- No permitir que las muestras entren en contacto con alguna superficie que contenga restos de otros fluidos biológicos (por ejemplo: pinzas sucias, guante manchado de sangre, superficie de trabajo contaminado).
- Utilizar de preferencia pinzas de superficies lisas para la recolección de objetos con manchas de saliva que sean fáciles de limpiar.
- Herramientas como son pinzas tijeras, escalpelo, se pueden limpiar con un chorro de agua destilada y secar con papel especial. Repetir este proceso dos veces antes de usar la herramienta para manipular otra muestra de fluido biológico¹⁸. (Figura 6)

M. CADENA DE CUSTODIA PARA LA EVIDENCIA QUE SE VA AL LABORATORIO FORENSE

La cadena de custodia es todo el proceso documental para asegurar que la muestra no sea implantada, alterada o contaminada y evitar su pérdida iniciando con un proceso de recolección de pruebas, sean del tipo que sean. Todo el proceso debe ser transparente y objetivo y debe de quedar debidamente registrado.

El objetivo de la cadena de custodia es asegurar la integridad de la evidencia estableciendo protocolos de protección de la muestra durante su traslado siendo de vital importancia en una investigación. Esto reducirá la probabilidad de un desafío a la integridad de la evidencia.

La cadena de custodia es uno de los puntos más críticos al momento de ser trasladado al laboratorio, por esta razón es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos para asegurar su integridad:

- El indicio que salga del lugar donde se cometió el supuesto delito vaya en sus empaques adecuados debidamente etiquetados, precintados, con la documentación correspondiente donde conste la forma clara el nombre y forma de la autoridad responsable de su transporte.

- Que el transporte se efectuó en los medios adecuados sin producirle daños ni alteraciones al material.
- Que la persona que reciba el material en el laboratorio compruebe que las bolsas y contenedores de su transporte que contenga la evidencia tengan los precintos originales, con los que salieron del sitio del supuesto delito perfectamente intactos

Es esencial cumplir adecuadamente con la cadena de custodia de la evidencia. A través de la debida documentación, recolección y preservación de la evidencia y garantizando de esta manera su integridad

Cumpliendo con los requisitos para el transporte de la evidencia se puede garantizar que el material que se va analizar en el laboratorio no haya sufrido alteraciones ni manipulación por terceros^{19, 20}.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la investigación de un supuesto delito, es común buscar la presencia de manchas de saliva, o cualquier otro tipo de fluido ya sea sangre, semen, fluido vaginal, sudor lagrimas etc.; la detección de saliva es particularmente importante para la comprensión a detalle de un supuesto delito, para esto es necesario una rápida identificación ya que estos tienden a degradarse a las condiciones ambientales; la saliva es un fluido que puede proporcionarnos información importante, delimitando la lista de probables sospechosos. Debido a que se desconocen las pruebas rápidas que comercialmente se ofrecen para la investigación forense en la identificación de manchas de saliva, es importante conocer los fundamentos de las pruebas químicas de resultados inmediatos más importantes y ampliamente utilizados que existen actualmente en el mercado.

La detección de saliva en casos forenses es una herramienta invaluable, cuando es usado junto con otras pruebas que demuestran la relación que tiene el presunto o presuntos sospechosos con la víctima; las pruebas de saliva van a ayudar a demostrar las presuntas agresiones que la persona agredida pudo haber sufrido. Las muestras se pueden obtener tanto de las personas involucradas, así como del lugar donde se pudo haber llevado el supuesto delito o la supuesta agresión, la toma de muestras se puede llevar a cabo mediante hisopos en áreas tales como: cuello, pecho, genitales, cigarrillos vasos o cualquier otro indicio donde se sospeche que haya muestras de saliva.

El problema se presenta cuando existen casos en donde la fiscalía alega que las pruebas presentadas que establecen la presencia de saliva humana en la víctima forma parte de un conjunto de evidencias presentadas en donde se llevó a cabo el supuesto delito. Este tipo de pruebas se ve a menudo en víctimas de agresión sexual. En casos como este es importante entender como la pruebas en kits comerciales para detectar saliva puede generar controversia, si esta pruebas llegasen a presentar falsos positivos que delimiten la confiabilidad del alcance de la identificación de manchas de saliva.

III. OBJETIVOS

GENERAL

Realizar una investigación bibliográfica acerca de la importancia de la α -amilasa salival en la investigación de un supuesto delito y la utilidad que puede tener para un laboratorio en la investigación forense.

PARTICULAR

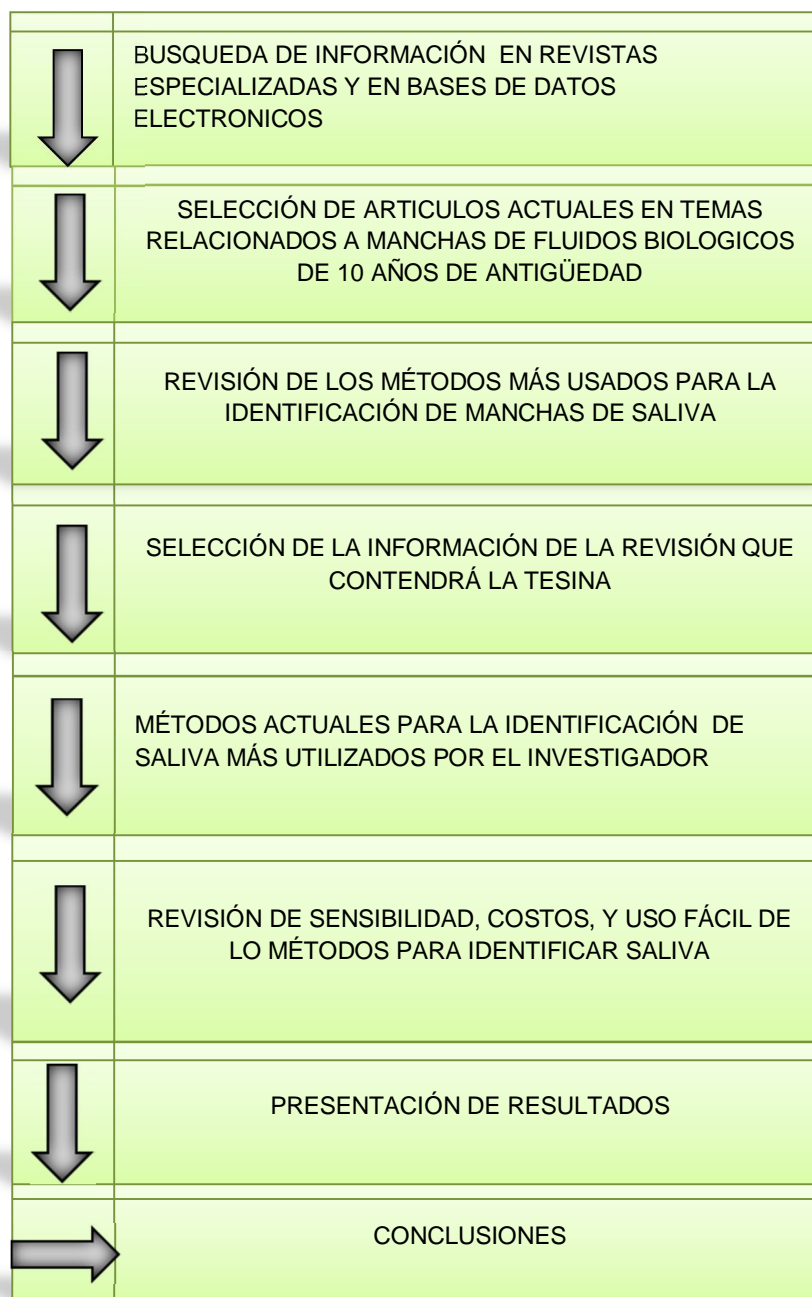
De la revisión bibliográfica, diferenciar las pruebas químicas que existen en Kits comerciales que identifican α -amilasa salival humana.

De la investigación relacionada mencionar las ventajas y desventajas de los kit comerciales para el investigador forense.

IV. METODOLOGÍA

El presente proyecto es de tipo retrospectivo de analisis documental que se realizo en tres etapas:

1. Investigación bibliografica en investigacion forense actualizada
2. Selección de informacion de interes para el proyecto
3. Elaboracion de la tesina con la informacion seleccionada



V. RESULTADOS

Se encontraron publicaciones y organizaciones que contienen información actualizada sobre la investigación forense. La ciencia forense engloba muchas disciplinas que van desde la aplicación de todas las ciencias de la ley, tanto civiles como penales. Además las ciencias forenses incluye a la arqueología hasta la zoología y su aplicación engloba todos los tipos de delito, desde incendios hasta lavado de dinero y evasión de impuestos. La investigación científica del delito debe realizarse a través de métodos racionales prácticos y válidos y que el servicio que ofrezcan sea imparcial y sin concesiones a la justicia. Con el desarrollo de la tecnología computacional la información de las ciencias forenses se encuentra al alcance de los estudiantes y profesionales en esta área. Se encontraron publicaciones y organizaciones en investigaciones actuales sobre las ciencias forenses, ejemplos de revistas y organizaciones especializadas en temas forenses son los siguientes:

Revista de interés para el investigador forense: Forensic Magazine, Forensic Science Communications, Forensic Teacher Magazine, Toxicology Global Forensic Science Today, Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology, Journal of Clinical Forensic Medicine, Journal of Forensic Nursing, Journal of Forensic Sciences, Médico-Legal Update, MedSun, Skopein, Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology, ASCLD Newsletter, Digital Investigation, Directorio Forense

Organizaciones importantes para el investigador forense: Forensic Science Society, British Academy of Forensic Sciences, National Center for Forensic Science, Board of Forensic Document Examiners, International Association for Identification (IAI), International Association of Forensic Sciences, National Center for Forensic Science, The Royal Society of Medicine, Society of Forensic Toxicologists (SOFT), Zeno's Forensic Site.

Bases de datos de ayuda para la investigación forense: Ciencias Forenses.cl, NCBI,

Cuadro 1. Generalidades encontradas sobre la saliva para uso forense^{21, 22,23}

- El rango de referencia de α -amilasa encontrado en saliva humana es de 0.2-6.4 mg/ml
 - 0.5 μ l de saliva seca puede ser detectada con actividad intermedia o alta de la amilasa
 - 2 μ l de saliva seca puede ser detectada con baja actividad de la amilasa
 - El límite de detección ideal para manchas de saliva con actividad de la amilasa intermedia o alta es de 0.5 μ l en 5 min
 - El promedio de concentración de amilasa en saliva humana es 0.072-1.3 UI/ μ l
 - La concentración mínima y máxima de ADN que se puede obtener de saliva fresca es de 125 μ g/ml hasta 795 μ g/ml
 - La concentración mínima y máxima de ADN que se puede obtener de manchas secas de saliva es de 15 μ g/ml hasta 85 μ g/ml
-

Cuadro 2. Técnicas para identificar saliva o α -amilasa salival

COMPONENTE	CLASIFICACIÓN	PRUEBA
Toda la saliva	Fuentes de luz	Luz ultravioleta (415-490nm con el 60% de efectividad Polilight® (310-650 nm) Anexo 1
α-Amilasa	Químico	Starch-Iodine Phadebas® RISD SALIgAE
Anticuerpos	Inmunológico	ELISA Inmunodifusión
Elementos	Espectroscópico	SEM-EDX (potasio) (Scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectroscopy)
Marcadores		RT-PCR

Cuadro 3. Pruebas utilizadas comúnmente para el análisis de la saliva por el investigador forense^{24, 25, 26,}

PRUEBA	TIPO DE PRUEBA	FUNDAMENTO
Red Starch Paper (Starch-Iodine)	Prueba Catalítica	El almidón –iodo detecta la actividad de la α -amilasa, debido a que el yodo reacciona con el almidón, produciendo un color purpura. En presencia de α -amilasa la intensidad del color disminuye a medida que el almidón reacciona con la amilasa liberando al yodo
Phadebas® amylase test	Prueba catalítica	Consiste en micro esferas de almidón con colorante azul insoluble en agua (reticulado) ligado al almidón en la presencia de la amilasa el almidón es hidrolizado liberando el colorante en la solución
SALIgAE- saliva test	No especificado	El mecanismo exacto de esta prueba no se conoce debido los derechos del propietario, y sus estatus no ha sido liberado
Rapid stain Identification Test (RSID^{RM})	Prueba catalítica inmunocromatográfica	El RSID ^{RM} usa dos anticuerpos monoclonales de amilasa anti-salival en flujo lateral que detecta la presencia de amilasa salival, en lugar de la actividad de esta enzima.

Cuadro 4. Ventajas y desventajas de las pruebas utilizadas en análisis de la saliva^{12, 15, 1, 12,13}

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Red Star Paper (Starch-Iodine)	Relativamente barato, Detecta amilasa una mezcla de saliva y semen	De difícil interpretación en trazas débiles en reacciones positivas, falsos positivos en lociones y detergentes
Phadebas® amylase test	Relativamente barato, rápido, muy sensitivo, es ideal para cuantificar y medir la actividad de la α -amilasa	Falsos positivos, en cremas de manos, loción facial, en orina y heces hubo resultados positivos
The Rapid stain Identification Test (RSID ^{RM})	Preciso, reproducible, fácil de usar, muy específico para saliva humana, rápido y confiable	Debido a su alta sensibilidad da falsos positivo en leche de mama
SALIgAE- saliva test	Rápida interpretación	Posibles resultados negativos de la prueba. Puede no detectar la actividad de la α -amilasa

Cuadro 5. Comparación de la sensibilidad, especificidad y estabilidad de las pruebas utilizadas para la identificación de la saliva

Prueba	Sensibilidad	Especificidad (+)	Especificidad de especie (+)	Resultados
Red Starch Paper (Starch-Iodine)	0.0116 UI/ μ l 10 μ l	B, C	b, e	15 min-40 min
Phadebas® amylase test	32 μ l-0.5 μ l 9 nl 90 ng 0.0046 UI/ μ l	D	a, b, c, d, e, f,	5-10 min
The Rapid stain Identification Test	0.5 μ l (saliva Humana) hasta 1.0 μ l (puede detectar hasta 0.1 nl 0.5 ng	A, B, C, D	b	10 min estabilidad de 11 días a 37°C
SALIgAE-saliva test	40ng 4 nl 1.16 UI/ μ l	A, B, C, D	a, b, c, d, e, f	10 min

a) Cerdo, b) rata, C) ratón, d) conejo, e) cerdo de guinea, f) Hámster, g) perro h) gato

*el promedio de concentración de amilasa en saliva humana es 0.072-1.3 UI/ μ

+A) leche de mama, +B) Orina (masculino y femenino), +C) Hisopos fecales +D) amilasa pancreática

DATOS TÉCNICOS

Prueba de Phadebas: Los laboratorios de criminalística usan un reactivo químico llamado Phadebas® para identificar α -amilasa salival humana como prueba presuntiva. Esta prueba es relativamente barata, rápida y altamente sensitiva para la detección de la actividad de α -amilasa sin embargo es importante tener en cuenta que esta prueba no puede ser confirmativa dado que es una prueba presuntiva, y daría resultados positivos si hay α -amilasa de cualquier otro organismo presente. El principio de la prueba se basa en que el sustrato es un polímero de almidón, insoluble en agua, de eslabón cruzado. Que porta un colorante azul, se hidroliza mediante la α -amilasa dando lugar a fragmentos azules en agua. La absorbancia de la solución azul es una función de la actividad de la α -amilasa de la muestra (anexo 4).

Prueba rápida de identificación (RSID^{RM}): Con el desarrollo de nuevos métodos para identificar α -amilasa salival, basados en anticuerpos monoclonales, se empezaron a utilizar Kits en los laboratorios de ciencia forenses en todo el mundo, para la detección de saliva humana, conocida por muchos investigadores como tiras de pruebas inmunocromatográficas de flujo lateral o pruebas de identificación rápida de manchas de saliva (RSID).

Los kits de RSID-saliva en diferentes tipos de muestras o superficies como son: colillas de cigarrillos, papel, botellas de plástico y vidrio, latas de metal etc. La especificidad de los kits de RSID-saliva ha sido examinada por los investigadores. Aunque fueron sensitivos y específicos a saliva humana, también hubo reacciones positivas en muestras que contenían α -amilasa de mamíferos, tales como gorilas y ratas. También hubo reacciones positivas en otros fluidos corporales que fueron: semen, sangre, secreciones vaginales y sudor. También se observaron pruebas positivas en leche materna, heces humanas, muestras de orina. Aunque algunas organizaciones y autores mencionan que se consideran confirmativas, todas estas limitaciones muestran lo contrario.

Es importante considerar todas estas limitaciones cuando se examinan y revisan los kits de prueba para identificar saliva y amilasa salival del presunto agresor dado que por falta de pericia del investigador la resolución de un caso puede verse afectada.

La saliva puede tener células provenientes de la mucosa, la no destrucción de las muestras de saliva se puede utilizar para un prueba subsiguiente de ADN para descartar o descartar la relación del individuo con la evidencia forense (anexo 5).²⁷

SaligAE es un test para la identificación forense de saliva, tiene la habilidad de detectar cantidades mínimas (40 ng). Es altamente sensible y específico, la

reacción ocurre cuando se le agrega un extracto de saliva, es un reactivo incoloro que cambia a amarillo brillante en presencia de saliva (anexo 6). Los fabricantes aún no han revelado el mecanismo de reacción del test de saliva SaligAE²⁸.

VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después de una búsqueda bibliográfica sobre técnicas de identificación de manchas de saliva y la utilidad que tienen para una investigación, en donde supuestamente se llevó a cabo el delito se encontró que el análisis de este fluido ayudara al investigador a dar un dictamen sobre la participación de la persona o personas involucradas.

De los fluidos biológicos, la saliva es de los tres que más se encuentra en la escena del supuesto delito, después de la sangre y el semen, la saliva se encuentra en cantidades suficientes para una investigación en el esclarecimiento de índole legal; debido que se degrada a condiciones ambientales, la elección de un buen método de identificación de saliva es importante, evitando destruir la muestra, es de vital importancia para el investigador ya que los métodos modernos actuales se basan en la identificación forense del análisis del ADN y la saliva es uno de los fluidos que contienen cantidades suficiente para llevar a cabo un estudio basado en el ADN.

Los resultados indican que la α -amilasa encontrada en saliva humana es de 0.2-6.4 mg/ml, de esta forma cantidades muy pequeñas que van desde 0.5 μ l a 2 μ l pueden ser detectadas en tan solo 5 minutos con métodos y técnicas basadas en la actividad de α -amilasa; los resultados mostraron también que la cantidad de ADN puede variar dependiendo de las condiciones en que se encuentre la saliva. Para manchas de saliva pueden ser detectadas desde 125 μ g/ml hasta 795 μ g/ml y 15 μ g/ml hasta 85 μ g/ml en saliva fresca y manchas secas de saliva respectivamente; estos resultados que se encontraron demuestran que la saliva debe de considerarse de relevancia en la investigación forense y darle el lugar que como fluido biológico le corresponde, pues los métodos modernos que cada vez son más sensibles a algún componente de la saliva puede ser determinante en la resolución de un caso.

La revisión bibliográfica también indica la evolución de los métodos para identificar saliva, empezando con una fuente de luz, hasta la identificación de anticuerpos a la identificación de un componente químico que se encuentre en abundancia en la saliva, tal es el caso del potasio que se encuentra en cantidades suficientes para ser detectable más que cualquier otro elemento.

Los resultados mostraron también que las pruebas encontradas no se consideran confirmatorias, sino presuntivas aun con los intentos de desarrollar métodos más específicos tales como: el uso de antisuero selectivo, inhibidores químicos e inhibidores de anticuerpos monoclonales y aun así no se consideran confirmatorios pues aún se encuentran en fase de desarrollo y la estandarización

de un método confiable para el investigador. Los resultados mostraron que los métodos investigados y ampliamente aceptados en la investigación forense se basan las pruebas catalíticas o inmunocromatograficas.

Las pruebas catalíticas se basan en la actividad de la α -amilasa, esta enzima es de los componentes más abundantes de la saliva, contiene entre el 10% al 20% del total de las proteínas, La α -amilasa contribuye en la digestión de los alimentos a través de la hidrólisis del almidón a glucosa y maltosa¹⁷. La α -amilasa es la mejor enzima amilolitica conocida, es decir va actuar sobre la amilosa y la amilopectina que son dos componentes principales del almidón. En general cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4-glucosídicos en el almidón y α -glucanos relacionados. Esta reacción es aprovechada por las pruebas químicas en una investigación forense identificando esta enzima mediante un cambio de color si se encuentra la enzima presente en un indicio.

Este es el principio básico que siguen la mayoría de los Kits de prueba de identificación de saliva o α -amilasa salival, obteniendo ventaja de la reacción del almidón- α -amilasa.

El método inmunocromatografico utilizado se basa en el uso de anticuerpos de la amilasa detectando a esta enzima, y no basándose en su actividad como en las pruebas catalíticas.

Para la elección de un método químico para detectar amilasa salival va a depender del investigador, de la revisión se puede ver que cada método tiene sus ventajas y desventajas, un método demasiado sensible puede dar falsos positivos y el método poco especifico será difícil que detecte solo saliva humana

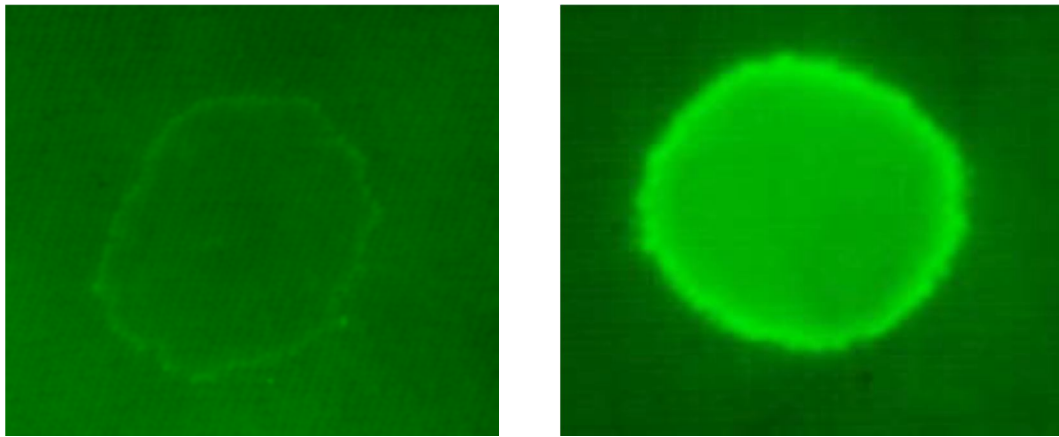
VII. CONCLUSIONES

En base a la información obtenida y analizada en función de la utilidad al proyecto, se formulan las siguientes conclusiones:

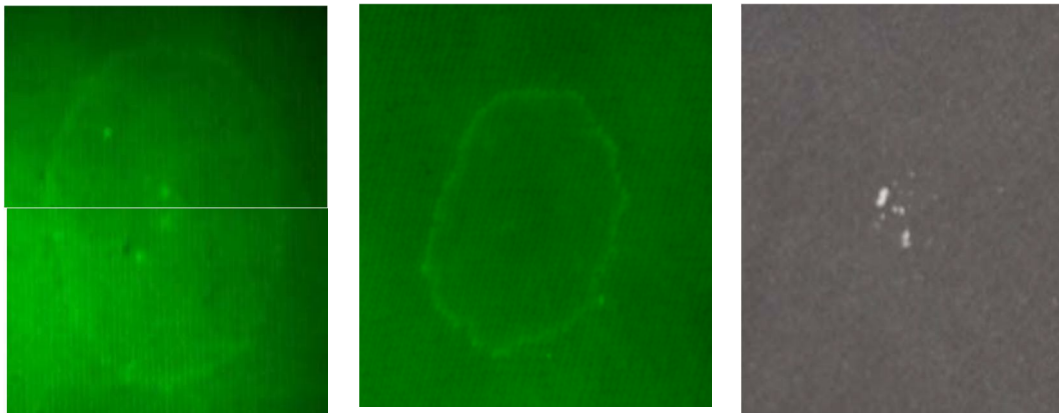
1. Hay numerosas técnicas para identificar saliva, desde las más antiguas hasta las más modernas en vías de desarrollo, las cuales pueden ser aplicados en la identificación forense de la muestra encontrada en la escena del delito donde supuestamente se llevó a cabo. Todas se consideran de naturaleza presuntiva, desde las que identifican manchas hasta las técnicas más actuales que utilizan anticuerpos monoclonales o marcadores biológicos.
2. La elección del método va depender del investigador a fin de preservar la muestra lo más íntegramente posible, para posteriormente realizar el análisis del ADN de la misma.
3. Las pruebas químicas de identificación de saliva y sus componentes parecen presentar mayor ventaja por su sensibilidad y especificidad, pues pueden realizarse en la escena del crimen dando resultados en minutos con cantidades mínimas de muestra, dando opción de llevar a cabo otro análisis de naturaleza genética. En comparación con las técnicas actuales en desarrollo que necesitan llevar la muestra en el laboratorio utilizando equipo muy costoso para su identificación.
4. Con la revisión bibliográfica se pudo conocer que la saliva es un fluido biológico importante y existen métodos químicos en forma de Kit's comercial y aunque no sean pruebas confirmatorias si pueden ser específicos para detectar saliva cumpliéndose con el objetivo propuesto de la revisión de los métodos químicos para detectar saliva basando en la identificación de la α -amilasa.

VIII. ANEXOS

Anexo 1



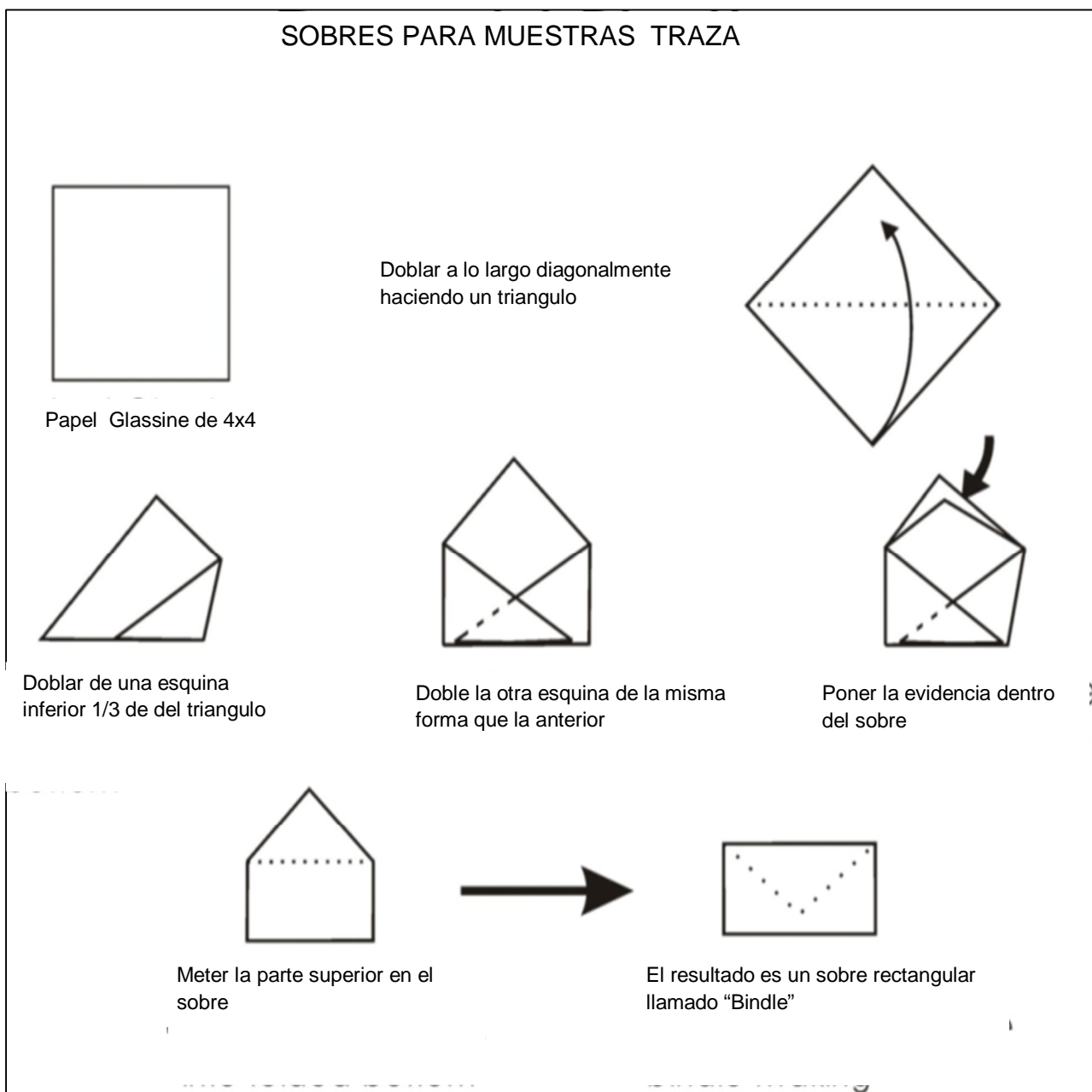
Diferencia de Fluorescencia de (a) manchas de saliva en algodón y fluorescencia de (b) manchas de semen en algodón visto con una fuente de luz ultravioleta



Ejemplos visuales del grado de fluorescencia de manchas de saliva con luz UV (c) Fluorescencia muy débil, (d) fluorescencia débil y (e) visible a simple vista

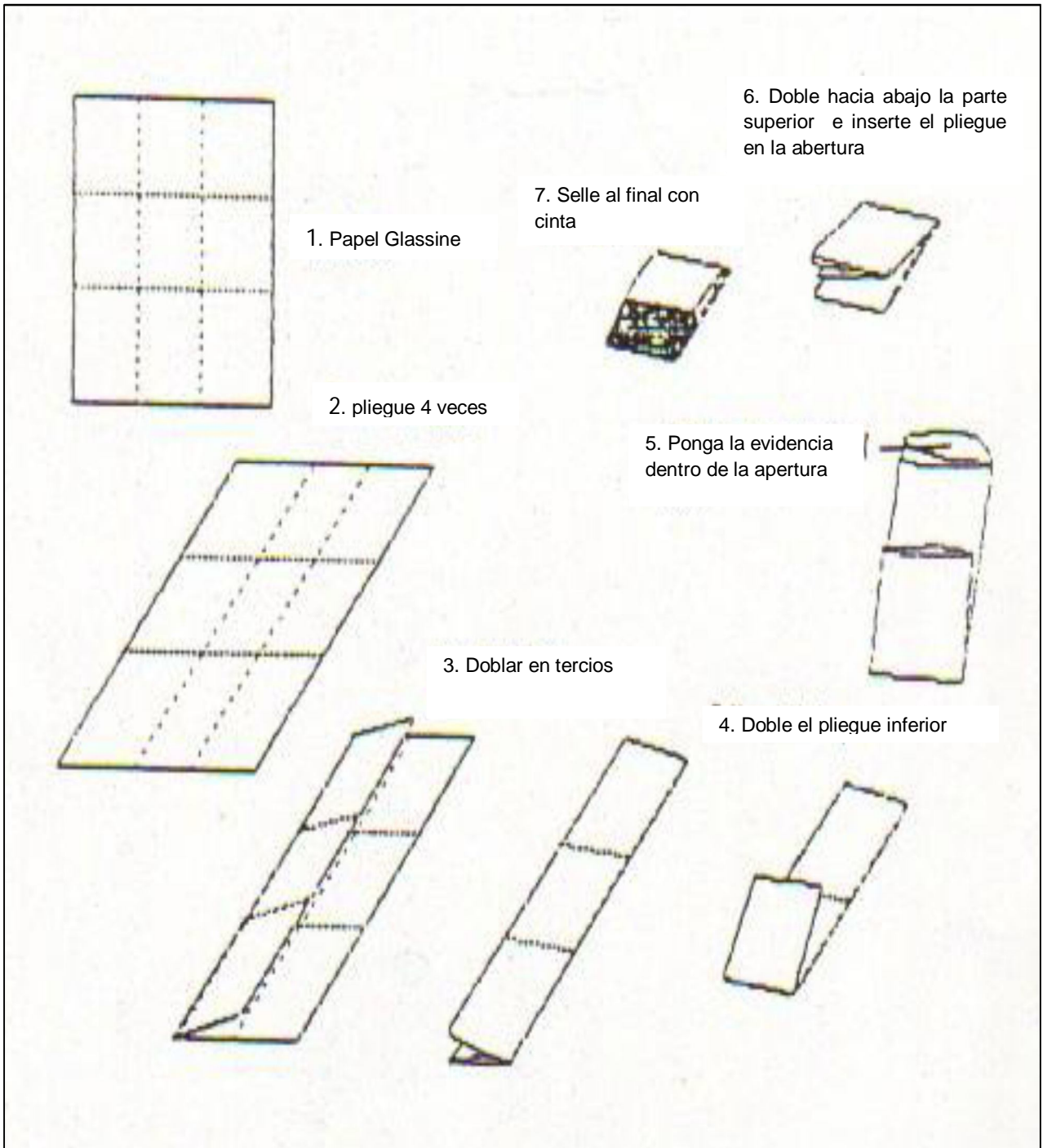
(Camilleri E, Sileniesks E, Henry J; Government Of South Australia Forensic Science SA Locating Saliva Stain Using the Polilight® and SALIgAE®. 2006).

Anexo 2



Forma sencilla de crear una envoltura para la muestra recolectada de un fluido biológico (33. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Crime scene Investigation; A Guide for law Enforcement, 7881 114th Avenue North Largo, FL 33773; 2013

Anexo 3



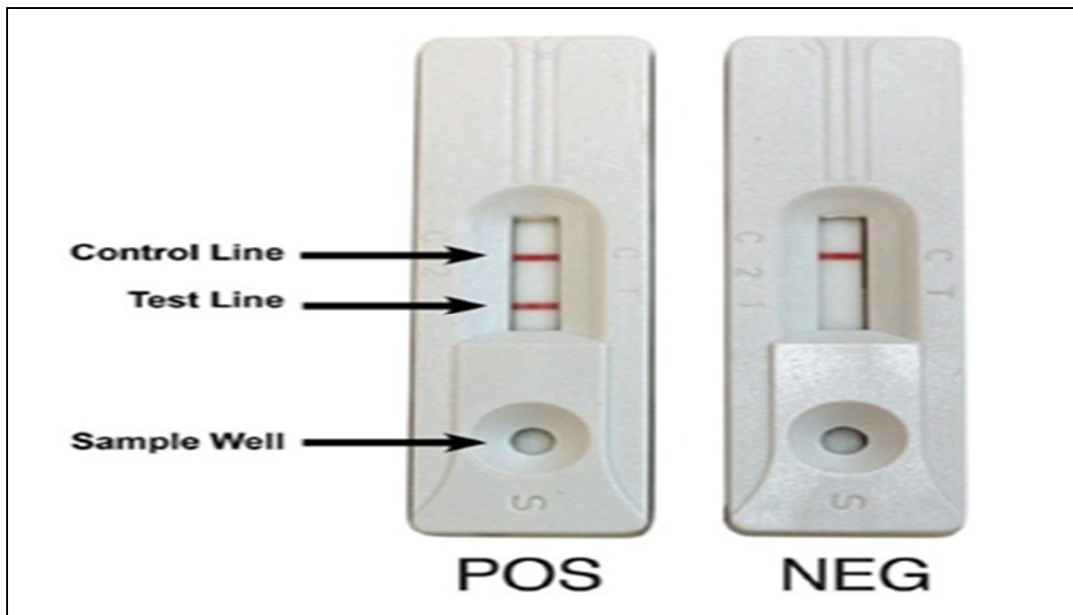
Fuente de elaboración desconocida (Bajado de: West Manheim Twp. Pólíce Dept.)

Anexo 4



Es usado frecuentemente para manchas sospechosas, en donde el color azul es positivo (tomado de http://www.phadebas.com/products/forensic_saliva_test_products)

Anexo 5



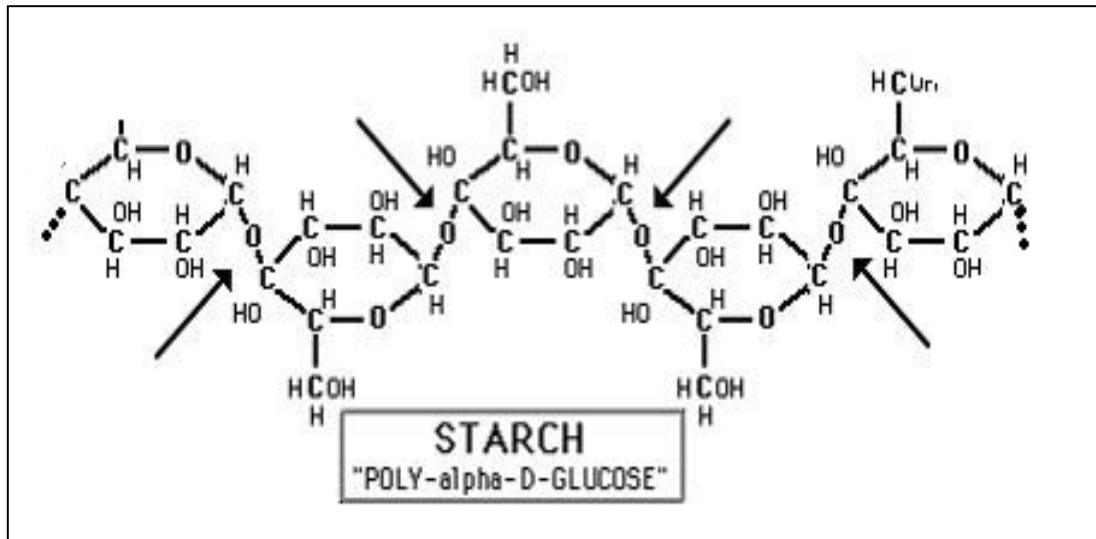
El dispositivo de prueba muestra un resultado positivo y negativo con la presencia o ausencia de saliva humana. El kit tiene una línea de control para asegurarse de que se llevó a cabo correctamente la prueba. (Scott DL, Seddon TJ. Did the DNA come from saliva? An investigation into the detection of saliva in forensic casework using Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID®-Saliva). Conference; Victoria Police Forensic Service Department, Macleod, Vic. 3085. Australia)

Anexo 6



Soluciones de SALIgAE en donde se tiene una muestra sin saliva (negativo) y con saliva (positivo). (Tomado de <http://abacusdiagnostics.com/saliva.htm>)

Anexo 7



Parte de la cadena del almidón con flechas que indican los puntos en donde tiene acción la enzima α -amilasa (tomado de http://www.phadebas.com/technical_info)

IX. REFERENCIAS

1. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*. 2009; 188:1–17.
2. Nakanishi H, Kido A, Ohmori T, Takada A, Hara A, Adachi A, et al. A novel method for identification of saliva by using PCR. *Forensic Science International*. 2009;183:20–23.
3. An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. *BMB Reports*. Department of Forensic Medicine. Yonsei University College of Medicine. Human Identification Research Center. 2012; Yonsei University, Seoul 120-752, Korea; 546-553.
4. Dick Warrington. Properly Packaging Evidence [database on internet]. *Forensic Magazine*, [Article Posted: February 12, 2013]. Disponible en: [<http://www.forensicmag.com/article/properly-packaging-evidence?page=0,1>]
5. An FBI Laboratory Publication Federal Bureau of Investigation. *Handbook of Forensic Services*. Quantico, Virginia 2007.
6. Zubakov D, Anton W, Boersma M, Choi Y, Patricia F, Kuijk V, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*. 2010; 124:217–226.
7. Benjamin C. Pang M, Bobbie K. Cheung K. Applicability of Two Commercially Available Kits for Forensic Identification of Saliva Stains. *Forensic Science International*. 2008; 53:1117-1121.
8. Oregon State Police Forensic Services Division. *Physical Evidence manual*. 2002-2010.
9. Janeček S, Svensson B, MacGregor EA. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013.
10. Hedman J, Gustavsson K, Ansell R. Using the new Phadebas® test to find crime scene saliva stains suitable for DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2008; 1:430-432.

11. Leo K. Legal issues in oral fluid testing. *J. Forensic Sci. Int.* 2005; 150:151-160.
12. Butterworth PJ, Warren PJ, Ellis PR. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch-journal.* 2011;63:395-405.
13. Illinois State Police, Division of Forensic Services. Evidence Packaging Procedures. 2010.
14. Quarino L, Dang Q, Hartmann J, Moynihan N. An Elisa Method for the Identification of salivary Amylase. *J. Forensic Sci.* 2005;50(4):1-3.
15. Bond JW, Hammond C. The Value of DNA Material Recovered from Crime Scenes. *J. Forensic Sci.* 2008 July; 53(4):797-801.
16. Casey DG, Price J. The sensitivity and specificity of the RSIDTM-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland. *Forensic Science International.* 2010; 194: 67–71.
17. Hedman J, Dalin E, Rasmusson B, Ansell R. Evaluation of amylase testing a tool for saliva screening of crime scene trace swabs. *Forensic Science International Genetics.* 2011; 5: 194-198.
18. California Department of Justice, Bureau of forensic Services, Physical Evidence Bulletin. Collection of Physical Evidence In Sexual Assault Investigation, California; 2007(7).
19. Fondebrider L, Mendoca MC. Protocolo Modelo para la Investigación Forense de Muertes Sospechosas Producidos por Violación de Derechos Humanos. Oficina del Alto Comisionado para los Derechos Humanos de las Naciones Unidas, Proyecto MEX/00/AH/10, Primera Fase del Programa de Cooperación Técnica para México. 2001.
20. U.S Department of Justice, Office of justice programs National Institute of Justice (NIJ). Death investigation: A Guide for the Scene Investigator, Washington, DC; 2011.
21. Myers JR, William KA, Comparison of Modern Techniques for Saliva Screening. *Journal of Forensic Sciences.* 2008; 53(4):862-867.

22. Saroch G, Reget P. A comparative study on UV spectrophotometric quantification of DNA extracted from human saliva. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2012; 2:123–125.
23. Miller DW, Hodges JC. Validation of Abacus SALIgAE® Test for the Forensic Identification of Saliva. WV State Police Forensic Laboratory. October 7th, 2005.
24. Old J, Brett S, Boonlayangoor PW, Reich K. Developmental Validation Studies of RSID-Saliva Lateral Flow Immunochromatographic Strip test for the forensic detection of Saliva. Independent Forensics Hillside IL 60162 RSID™-Developmental Validation. Rev. C. 2010.
25. Old J, Karl R. Developmental Validation Studies of RSID-Saliva Lateral Flow Immunochromatographic Strip test for the forensic detection of Saliva. Independent Forensics Lombard IL 60148 RSID-Developmental Validation Rev. B. 2006.
26. Aristidis A, Vasilis K, Sotirios K. Salivary Alpha-Amylase Activity and Salivary Flow Rate in Young Adults. *The Open Dentistry Journal*. 2013; 7:7-15.
27. Nouredine M. Forensic Test for Saliva: What you should know. [Database on the internet]. *The Forensic Nurse.com*. [August 15; 2011; cited 2013 August 21]. Disponible en:
<http://ncforensics.wordpress.com/2011/08/15/forensic-tests-for-saliva-what-you-should-know/>.
28. Olsén EL, Edenberg E, Mattsson M, Ansell R. Phadebas® Forensic Press test and the presence of amylases in body fluids naturally deposited on textile. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2011; 3:e155-e156.
29. Evidence Guide North Carolina State Bureau of Investigation Crime Laboratory Division. 2010.
30. Vanderberg N, Oorshot HV. The Use of Polilight in the Detection of Seminal Fluid, Saliva, and Bloodstain and comparison with conventional Chemical-based Screening Test. *J Forensic Sci*. 2006;51(2):361-370.

31. Spruce C, Cooper P, Webb Laurence, Borowitzka A. Identification of Saliva: A comparison of the SALLgAE® test and The Rapid Stain Identification (RSD®) – Saliva test kit. Forensic Biology. Conference Path West Laboratory Medicine WA. Government of Western Australia.
32. Scott DL, Seddon TJ. Did the DNA come from saliva? An investigation into the detection of saliva in forensic casework using Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID®-Saliva). Conference; Victoria Police Forensic Service Department, Macleod, Vic. 3085. Australia.
33. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Crime scene Investigation; A Guide for law Enforcement, 7881 114th Avenue North Largo, FL 33773; 2013.
34. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice, A Simplified Guide To DNA Evidence. 7881 114th Avenue North Largo, Florida 33773; 2013.
35. Ballou S, Bamberger PS, Brown L, Brown R, Burney I, Davenport D et al. The Biological Evidence Preservation Handbook, Best Practices for Evidence Handlers. National Forensic Science Technology Center (NFSTC), Science Serving Justice. 2013.
36. State of Montana Department of Justice, Forensic Science Division. Evidence Handling Manual, Montana State Crime Lab. 2679 Palmer Missoula, Montana 59808; 2013.
37. Investigación Forense, “Un Soplón llamado ADN” [Página en Internet] México: Criminalística mx. [citado en 2013] Disponible en: <http://criminalistica.mx/areas-forenses/criminalistica/1441-investigacion-forense32>.
38. Wisconsin Department of Justice State Crime Laboratories. Physical Evidence Handbook. 7th Edition. Wisconsin: Printed in the United States of America; 2003.
39. Olson SR. Forensic Tests for Saliva: What you should know. [Monografía en internet]. Forensic Resource: Forensic Science in North Carolina. [Citado en Octubre 2013]. Disponible en: <http://ncforensics.wordpress.com/>.
40. Camilleri E, Sileniesks E, Henry J; Government Of South Australia Forensic Science SA. Locating Saliva Stain Using the Polilight® and SALLgAE®. 2006.

41. Martin NC, Clayson NJ, Scrimger DG. The sensitivity and specificity of Red-Starch paper for the detection of saliva. *Sci & Just.* 2006; 46(2): 96-105.