

СУЧАСНІ ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ В СУДОВО-МЕДИЧНІЙ ІМУНОЛОГІЇ

©М. М. Шевчук, Ю. В. Демчук

КЗ ЛОР «Львівське обласне бюро судово-медичної експертизи»

Резюме: З часом все більш актуальним постає питання збереження біологічного матеріалу, виявленого в слідах на речових доказах при проведенні імунологічних експертиз для подальшого застосування молекулярно-генетичних методів дослідження, що у свою чергу підвищує доказовість і об'єктивність судово-медичних експертних підсумків. В статті запропоновані напрямки, послідовність дій та методики проведення сучасних імунологічних експертиз.

Ключові слова: імунологічні дослідження, молекулярно-генетичні дослідження, сліди біологічного походження, РАЕ, КРА, РІФ, ІФА.

ВСТУП

Сучасна судово-медична імунологія володіє методами виявлення групових антигенів численних ізосерологічних систем як в рідкій крові, так і в її слідах, різних виділеннях, волоссі. Реакції, що застосовуються сьогодні: реакція абсорбції в кількісній модифікації, реакція абсорбції-елюції, змішаної аглютинації дозволяють виявляти антигени в слідах крові дуже малих розмірів. Реакцію гальмування аглютинації використовують для виявлення групових антигенів сироваткових систем крові, таких як Gm, Km(Inv). Доцільне виявлення групових антигенів одразу декількох ізосерологічних систем, таких як Rh, MNSs, P та інших, що дозволяє суттєво розширити можливості групової ідентифікації і диференціювання. Одним з прогресивних методів дослідження є метод генетичного аналізу. Він має певні переваги: застосовується в роботі з мінімальною кількістю матеріалу, який може бути частково зруйнованим, має високу інформативність, дозволяє швидко отримати результат. Застосування полімеразної ланцюгової реакції є прийнятним для будь-якої тканини, з якої можна виділити ДНК. В практичній роботі такими об'єктами є кров, слина, сперма, їх плями, а також волосся. При наявності рідкої крові дослідження ДНК широко проводиться в лабораторіях. Але, при дослідженні плям крові, виділень і особливо змішаних плям, результати не завжди позитивні, що пояснюється багатьма причинами. Перш за все, з плями не завжди можна виділити ДНК. Але при виділенні ДНК в змішаних плямах не завжди можна зробити висновок про приналежність крові і виділень окремії особі.

Таким чином, існує багато методик, визначення групової приналежності в будь-яких об'єктах біологічного походження (кров, виділення, волосся, кістка та ін.). Недоліком вказаних методик є або їх низька чутливість (реакція КРА), або їх неспецифічність (реакція РСА і РАЕ), або вплив предмета-носія, який впливає на сироватки, в результаті чого антигенна приналежність не може бути встановлена. Не виявлення може бути пов'язане зі слабкими властивостями самого антигена. Крім того за останні 5-10 років почали зустрічатися випадки не виявлення антигенів системи АВ0 навіть у свіжих зразках крові, виділень, волосся. При різних захворюваннях, таких як лейкоз, туберкульоз, грип, грибові ураження відмічається не правильне визначення груп крові (відсутність аглютинації, неможливість ідентифікації антигенів і т.ін.).

Метою дослідження було провести аналіз імунологічних методів дослідження, придатних для отримання максимального об'єму інформації, з метою ідентифікації особи.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У зв'язку з тим, що змінилася роль класичних імунологічних досліджень, змінились і вимоги до їх проведення. Оскільки, данні методи пропонується використовувати на перших стадіях експертизи, вони мають виконуватися так, щоб забезпечити збереження ДНК-вмісного матеріалу для наступних молекулярно-генетичних досліджень. Збереженню біологічного матеріалу для наступних досліджень сприяє введення методик, що мають високу чутливість або тих, що мають не деструктивний характер. Крім того, оскільки основні сили лабораторії повинні бути скеровані на отримання ідентифікаційних даних, а молекулярно-генетичні дослідження характеризуються складністю і великим об'ємом, бажано, щоб імунологічні методи відрізнялись високою технологічністю, були простими у виконанні і експресними.

Практично всі доказові методи, за допомогою яких вирішується питання про присутність крові в плямах на предмето-носіях, засновані на виявленні гемоглобіну і його похідних. Найбільш поширеним є метод тонкошарової хроматографії, який потребує наступного етапу - встановлення виду крові, на що витрачається багато часу. Крім того, при використанні даного методу можна отримати від'ємний результат через вплив на пляму різних хімічних і фізичних факторів. До того ж, при дослідженні цим методом мікрослідів не залишається достатньої кількості матеріалу для проведення подальших етапів дослідження, а при необхідності проведен-

ня повторної експертизи. Методи, що дозволяють встановлювати наявність сперми в об'єктах, засновані на виявленні сперматозоїдів. Але в деяких випадках різко знижується можливість виявлення сперматозоїдів на предмето-носіях, наприклад при приховуванні злочинів (заміті плями на одязі, гнилісні зміни біоматеріалу, вплив на плями зовнішніх чинників, лізис сперматозоїдів, відсутність сперматозоїдів). Тому також виникає необхідність пошуку доказових діагностичних методів.

Оптимізувати встановлення наявності і видової приналежності крові і сперми людини в плямах на речових доказах можна за допомогою імунохроматографічного методу за допомогою пристрою «Sera Quant». Імунохроматографічний метод по встановленню наявності гемоглобіна людини і простатоспецифічного антигену людини за допомогою пристрою «Sera Quant» і тест-касета, дозволяє встановлювати наявність крові і сперми в слідах на речових доказах, що зазнали впливу фізичних і хімічних факторів, а також в малих слідах, а у випадку сперми і при різних захворюваннях (оліго-, азооспермії). При проведенні такого методу одночасно визначається наявність і вид біологічного матеріалу. Дослідження є об'єктивним, наочним з кількісним визначенням досліджуваних факторів, результати зберігаються в базі даних.

В судово-медичній імунології основними методами для встановлення групової приналежності є реакція абсорбції-елюції (РАЕ), кількісна реакція абсорбції (КРА), реакція «змішаної аглютинації» (РЗА), реакція імунофлюоресценції (РІФ). Також використовують імуноферментний аналіз (ІФА) і метод імунохроматографії.

У відповідності з вимогами до аналізу об'єктів судово-медичної експертизи речових доказів необхідно модифікувати імунологічні методи і визначити черговість їх застосування для отримання максимально можливої інформації. Для підвищення специфічності РАЕ необхідно використовувати високочутливі методики модифікацій РАЕ. Однією з таких методик є використання гель-фільтрації для оцінки результатів РАЕ. Розроблена комбінована методика РАЕ – гель-фільтрація з використанням карточок «СканГель», що дає можливість проведення серійних досліджень. «СканГель» - сучасна технологія для визначення антигенів еритроцитів, скринінгу і диференціації антитіл, що використовує комбінацію методів аглютинації і гель-фільтрації. Всі тести проводяться в пластикових діагностичних карточках, які містять мікропробірки, заповнені поліакриламідним гелем. Гель може бути нейтральним або містити специфічні моноклональні антитіла, або антиглобуліновий реагент. Досліджувані еритроцити або стандартні еритроцити вносяться в відповідні мікропробірки, де відбувається реакція аглютинації, потім діагностичні картки центрифугують для розділення результатів реакції. При цьому еритроцити, що не аглютинували вільно проходять між часточками гелю і утворюють осад на дні мікропробірки, а еритроцити, що аглютинували розміщуються на поверхні або в товщі геля. Розміщення аглютинатів в гелі визначається силою аглютинації і позитивний результат може бути оцінений від 1+ до 4+. Розмір часточок гелю, спеціальний підбір моноклональних або поліклональних антитіл дозволяє досягнути найкращих результатів чутливості і специфічності. Розроблений варіант РІФ для встановлення групової і видової приналежності в дот-варіанті, що дає можливість експрес-аналізу з ціллю відбору об'єктів для подальшого дослідження. Прикладом dot-ELISA є тест-система Immuno Comb, в яких набори антигенів, необхідні для виявлення антитіл абсорбовані не в лунках, а на зубцях пластикової гребінки. Запропоновані модифікації РАЕ, дот-ІФА, дот-РІФ для малих кількостей виділень мають високий ступінь чутливості і дозволяють отримувати інформацію при аналізі окремих частин об'єкта, що в багатьох випадках дозволяє зберегти ядерний матеріал для молекулярно-генетичних досліджень.

Схема комплексного аналізу дозволяє досягти найкращих результатів при дослідженні в першу чергу мікрооб'єктів. Хоча, в теперішній час слід до будь-якого об'єкту відноситися як до мікрооб'єкту. При такому підході, в результаті економії біологічного матеріалу виникає можливість використовувати в дослідженні більшу кількість методів, отримувати об'єктивні і достовірні результати, зберегти біологічний матеріал для проведення повторних і додаткових експертиз.

На сучасному етапі розвитку судово-медичної експертизи речових доказів проведення будь-якої експертизи повинно починатися з імунологічних досліджень, основна роль яких – проведення скринінгу для відбору об'єктів з ціллю успішного проведення наступних молекулярно-генетичних досліджень. Встановлення групової приналежності бажано проводити в частині матеріала, отриманого з об'єкта та не придатного для генотипування. Економії біологічного матеріалу також сприяє використання методик, що мають високу чутливість і не деструктивний характер. Також важливо, щоб нові імунологічні методи відрізнялись високою технологічністю, простим виконанням, експресністю, що значно знизить працевтрати при визначенні групової і видової приналежності і дозволить проводити серійні дослідження при поступленні на експертизу великої кількості одноманітних зразків.

Зменшити працевтрати і скоротити тривалість виконання експертиз, особливо у випадках поступлення на експертизу великої кількості зразків, дозволяє заміна традиційного мікроскопічного методу оцінки результатів РАЕ на гелеві технології при дослідженні слідів крові. Такі ж переваги надає дот-ІФА при дослідженні виділень людини і дот- РІФ для попереднього відбору зразків.

Важливо також відмітити, що при використанні даних методик зменшується або повністю виключається вірогідність контакту рук експерта з тест-еритроцитами крові, що особливо актуально в наш час у зв'язку з поширенням СНІДу і гепатитів. Крім того, є можливість підтвердити експертні висновки документально, що підвищує об'єктивність отриманих даних.

Методика одностадійного варіанту дот-ІФА в порівнянні з розробленим раніше двостадійним варіантом більш експресна, надійна, методично проста. Також вона надає інформацію не тільки про групову характеристику, але одночасно про видільництво. Таким чином, відпадає необхідність КРА, яка потребує багато матеріалу і не використовується для мікрооб'єктів.

Оскільки методика дот-ІФА виявляє антигени в рідкій частині виділень, вона дозволяє зберегти клітинний матеріал для проведення молекулярно-генетичного аналізу. Такі ж переваги має модифікація РАЕ, розроблена для виявлення А, В, Н антигенів слини в надосадовій рідині. Данні два методи можуть використовуватися для встановлення групової приналежності слідів тільки від видільників. В слині невидільників антигени виявляють за допомогою модифікації РАЕ на поверхні клітин. Все це сприяє більш правильній оцінці експертом результатів реакції.

При дослідженні волосся доцільно групові антигени виявляти в стержні, залишаючи цибулину, для молекулярно-генетичних досліджень. В даному випадку виникають проблеми, пов'язані з біохімічними і структурними особливостями даного об'єкту. Пропонується прогрівання стержня волоса на киплячій водянній бані. Дана процедура запобігає появі неспецифічних результатів. Крім того, розрихлення кератинової структури стержня внаслідок прогрівання полегшує доступ антитіл до антигенних структур волоса і таким чином призводить до підсилення специфічності реакції. В результаті підвищується надійність типування мікрофрагментів волосся і волосся осіб з слабкими антигенами системи АВ0.

Всі методики розроблені з урахуванням особливостей МКА і дозволяють з достатньою достовірністю використовувати їх в практиці судово-медичної експертизи. Але у експертів виникають певні труднощі з використанням МКА в реакціях. По-перше, це пов'язано з змінами початкових властивостей МКА при зберіганні. Пропонується розливати МКА на аліквоти для проведення щоденних досліджень і зберігати в замороженому вигляді. При такому способі МКА зберігають свої властивості протягом декількох років. По-друге, виробники МКА не завжди враховують специфічні потреби судово-медичної серології, зокрема титр антитіл буває недостатньо високий, що призводить до неможливості використання даних реагентів для типування, наприклад, таких складних об'єктів як волосся. У зв'язку з цим була запропонована методика приготування очищення реагентів з бажаним титром з культуральних і асцитних рідин шляхом осадження глобулінів сульфатом амоніа з наступною гел'фільтрацією на колонці, заповненій сефадексом G-25. Виявилось, що для виявлення антигена А у волосі доцільно використовувати імуноглобуліни, отримані осадженням сульфатом амоніа при 40 %-ому насиченні розчину сіллю, а для виявлення антигенів В і Н – при 50% насиченні.

В цілому ж впровадження в широку експертну практику сучасних імунологічних методів дослідження дозволить значно підвищити ефективність судово-медичної експертизи речових доказів біологічного походження. Для цього необхідно оснащення судово-медичних відділень сучасною апаратурою, діагностичними реагентами і реактивами, а також підвищення теоретичних і практичних знань на курсах спеціалізації і підвищення кваліфікації з судово-медичного дослідження речових доказів біологічного походження.

ВИСНОВКИ

Таким чином, серед основних сучасних принципів та методів дослідження речових доказів в судово-медичній імунології можна виділити:

- комплексний підхід що до проведення імунологічних досліджень, який сприяє збереженню біологічного матеріалу для наступних молекулярно-генетичних досліджень;
- оптимізація встановлення наявності крові та сперми людини в плямах на речових доказах за допомогою пристрою «Sera Quant»;
- введення методик, що мають високу чутливість і носять не деструктивний характер (комбінована методика РАЕ з використанням карточок «СканГель», дот-РІФ, дот-ІФА);
- скорочення термінів виконання експертиз (гелеві технології);
- висока технологічність, експресність, що дозволяють знизити працевтрати та провести велику кількість досліджень.

Література

1. **Барсеянц Л.О.** Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств (кровь, выделения, волосы) : рук. для судеб, медиков / Л. О. Барсеянц. М.: Медицина, 1999. - 271 с. - ISBN 5-225-04441-7.
2. **Гуртовая С.В.** Определение антигенов с помощью карточек «скангель» / С. В. Гуртовая, М. В. Маяцкая // Судеб.-мед. экспертиза. 2001. - №4. -С. 39-40.
3. **Гуртовая С.В.** Применение обти-теста для определения наличия и вида крови в пятнах / С. В. Гуртовая, Л. Н. Тучик, О. Б. Курджијева // Судеб.-мед. экспертиза. - 1999. №5. - С. 23-25.
4. **Иванов П. Л.** Судебно-биологическая экспертиза реалии и перспективы / П.Л. Иванов, В.А Клевно // Судеб.-мед. экспертиза. - 2008. - №1. - С. 19 - 24.

5. **Использование** моноклональных антител при экспертизе следов крови и выделений человека : методические рекомендации / И.О. П
6. **Экспертные** методики исследования тканей и выделений человека : учеб. пособие. М.: ЭКЦ МВД России, 2006. - 72 с.
7. **Эпитопная** характеристика анти-АВН моноклональных антител / М. И. Лапенков и др. // Проблемы гематологии. 1999. - № 2. - С. 39-44.
8. **Юдина Г. С.** Новые подходы к исследованию костной ткани по изосеро-логической системе АВО / Г. С. Юдина, Е. Ф. Зарецкая, И. О. Перепечина // Судеб.-мед. экспертиза - 2005. - № 6. - С. 34-37.
9. **«Современное** состояние судебно-медицинского исследования вещественных доказательств и пути развития» Барсегянц Л.О., Кинле А.Ф. Мат. VI Всероссийского съезда судебных медиков. - М. - Тюмень, 2005
10. **«Застосування** тестових систем встановлення наявності гемоглобіну крові та сімяної рідини при проведенні серологічних досліджень» Методичні рекомендації ЕС МВС України. Київ 2008

СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

Н. Н. Шевчук, Ю. В. Демчук

Резюме: Со временем все более актуальным становится вопрос сохранения биологического материала, обнаруженного в следах на вещественных доказательствах при проведении иммунологических экспертиз для дальнейшего применения молекулярно-генетических методов исследования, в свою очередь повышает доказательность и объективность судебно-медицинских экспертных итогов. В статье предложены направления, последовательность действий и методики проведения современных иммунологических экспертиз.

Ключевые слова: иммунологические исследования, молекулярно-генетические исследования, следы биологического происхождения, РАЭ, КРА, РИФ, ИФА.

MODERN PRINCIPLES AND METHODS OF OBJECTS OF BIOLOGICAL ORIGIN IN FORENSIC IMMUNOLOGY

M. Shevchuk, V. Demchuk

Summary: Over time, the more important question is the preservation of biological material discovered in the wake of material evidence during the immunological expertise for the further application of molecular genetic research methods, which in turn increases the objectivity of evidence and forensic expert results. The article suggested directions, the steps and methods of modern immunology expertise.

Keywords: immunological research, molecular genetic studies, traces of biological origin, RAE, CRA, REEF, IFA.