© В. Л. Сидоров, О. Д. Ягмуров, А. В. Коноваленко, 2015 г.
УДК [340.6-073.56]:612.31

В. Л. Сидоров, О. Д. Ягмуров, А. В. Коноваленко

ПРЕИМУЩЕСТВА ПРИМЕНЕНИЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ СЛЮНЫ В ПЯТНАХ, СЛЕДАХ И УЧАСТКАХ НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Бюро судебно-медицинской экспертизы, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Наличие слюны при исследовании вещественных доказательств устанавливают в смывах, изъятых с места происшествия на марлевые или ватные тампоны, на заклеенных конвертах, на предметах одежды при половых преступлениях, на кусках тканей, при подозрении на использовании их в качестве кляпа, реже — на окурках [2—4].

В отечественной судебно-медицинской практике для установления наличия слюны достаточно долгое время применяется пробирочный метод [1], а также методика в агаре, предложенная А. Л. Федоровцевым в 1998 г. [5]. Однако эти методы носят сугубо субъективный и качественный характер.

Наши зарубежные коллеги применяют для данной цели другие методики: тест на амилазу по Фадебазу [8], визуальный тест на уринарную амилазу [11, 13]; специальные тест-полоски (стрипы), меняющие свою окраску при наличии амилазы в исследуемых вытяжках [12], метод иммуноферментного анализа (ИФА) [9] и кинетический метод [7], основанные на объективной количественной регистрации амилазы в исследуемых вытяжках. Особо важно отметить факт, что зарубежом выделяют две различные формы а-амилазы, продуцируемые человеческим организмом: а-амилаза-1, которая содержится в слюне грудном молоке и потожировых выделениях, а также а-амилаза-2, которую находят в секрете поджелудочной железы, сперме и влагалищных выделениях. а-амилазу-1 обнаруживают преимущественно в слюне, но по своей ферментативной активности она практически неотличима от а-амилазы-2. Поэтому все методики, направленные на выявлении а-амилазы, сопровождающиеся каким-либо окрашиванием, могут быть использованы только как ориентировочные реакции для определения наличия слюны. Доказательные методики являются иммунологическими и основаны на реакции «антиген-антитело» [5].

Развитие новых технологий, а также актуальность проведения большого объема ориентировочных поисковых реакций экспресс-методами при проведении судебно-биологических экспертиз вынуждают искать новые подходы для решения экспертных задач, поскольку имеющаяся в арсенале экспертов-биологов отечественная методическая база устарела и значительно отстает от зарубежной.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Существуют тест-наборы для клинических (диагностических целей) по определению уровня а-амилазы в биологических жидкостях, предназначенные для биохимических анализаторов, где все исследования и измерения выполняются в кварцевых кюветах. На основе таких наборов нами были разработаны и апробированы две методики установления наличия слюны в пятнах на вещественных доказательствах с помощью определения активности а-амилазы в биологических жидкостях в полистирольных 96-луночных планшетах с плоским дном с объективной регистрацией результатов при помощи ридера «SUNRISE» фирмы «TECAN».

Одна методика проводилась с помощью тест-набора «Амилаза-Ново-1» российской фирмы «ВЕКТОР БЕСТ». Принцип этой методики заключается в том, что α-амилаза гидролизует CNP-олигосахарид с образованием CNP (2-хлор-4-нитрофенола). Скорость образования CNP прямо пропорциональна активности а-амилазы в исследуемой пробе. Ее количество измерялось фотометрически на ридере «SUNRISE» при длине волны 405 нм. Реакцию осуществляли следующим образом. Вырезки из следов экстрагировали дистиллированной водой в течение 18 часов в условиях бытового холодильника. В лунки полистирольного планшета многоканальным дозатором вносили по 5 мкл вытяжек из образцов и контрольных проб, раскапывали в лунки с субстратом. Добавляли в каждую лунку с внесенными пробами и образцами по 200 мкл реагента. Пробы инкубировали в термошейкере «ST-3» в течение 1 мин. Учет полученных результатов производили фотометрически измерением оптической плотности опытных и контрольных проб при длине волны 405 нм ридером «SUNRISE» фирмы *TECAN* с программным обеспечением «Magelan». При получении положительного результата пробы окрашивались в желтовато-коричневый цвет, и их оптическая плотность составляла от 0,1 до 3,0 условной единицы, в зависимости от количества амилазы.

Вторая методика — унифицированный метод Каравея «АМИЛАЗА-ОЛЬВЕКС». Принцип этой

Таблица 1

Зависимость оптической плотности, измеренной посредством ридера "SUNRISE" в лунках планшета, от разведения жидкой слюны и мочи, а также экстрактов из слюны человека, высушенной на марле (тест-набор "Амилаза-Ново-1")

Исследуемые образцы	Разведения	Значения оптической плотности в у. е. (M±m)
Слюна (жидкая)	1:100	1,817±0,074
	1:1000	0,211±0,042
	1:2000	0,120±0,037
	1:3000	0,094±0,029
Слюна (высушенная на марле)	Цельный экстракт	3,205±0,087
	1:10	2,201±0,079
	1:50	0,510±0,064
	1:100	0,284±0,057
	1:200	0,161±0,048
Отрицательный контроль (моча жидкая)	1:200	0,044±0,035
Положительный контроль (слюна высушенная на марле)	1:10	2,115±0,081

методики заключается в том, что а-амилаза расщепляет крахмал, и при добавлении раствора йода не наблюдается синего окрашивания.

Для проведения настоящего исследования был использован набор реагентов российской фирмы-производителя «ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ», который применяется для определения активности α-милазы в биологических жидкостях. В состав набора входят следующие готовые компоненты: фосфатный буфер; концентрированный субстрат (крахмал по Lintner); концентрированный раствор йода; раствор фторида калия; соляная кислота.

Этапы исследования были следующими. Вырезки из следов экстрагировали дистиллированной водой в течение 18 часов в условиях бытового холодильника. В лунки полистирольного планшета многоканальным дозатором вносили по 30 мкл субстратно-буферного раствора. По 5 мкл вытяжек из образцов и контрольных проб раскапывали в лунки с субстратом. Пробы инкубировали в термошейкере «ST-3» в течение 10 мин. Останавливали реакцию внесением 240 мкл раствора соляной кислоты, а для ее проявления добавляли по 20 мкл рабочего раствора йода. Учет полученных результатов производили фотометрически измерением оптической плотности опытных и контрольных проб при длине волны 630 нм ридером «Sunrise» фирмы *TECAN* с программным обеспечением «Magelan».

Таблица 2

Зависимость оптической плотности, измеренной посредством ридера "SUNRISE" в лунках планшета, от разведения жидкой слюны и мочи, а также экстрактов из слюны человека, высушенной на марле (тест-набор "Амилаза-Ольвекс" метод Каравея)

Исследуемые образцы	Разведения	Значения оптической плотности в у. е. (M±m)
Слюна (жидкая)	1:100	0,061±0,009
	1:1000	0,167±0,020
	1:2000	0,235±0,030
	1:3000	0,331±0,040
Слюна (высушенная на марле)	Цельный экстракт	0,045±0,040
	1:10	0,060±0,032
	1:50	0,112±0,019
	1:100	0,225±0,020
	1:200	0,296±0,023
Отрицательный контроль (моча жидкая)	1:200	0,416±0,014
Положительный контроль (слюна высушенная на марле)	1:10	0,074±0,007

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Набор реагентов «Амилаза-Ново-1» позволяет очень быстро (в течение 15 — 20 мин) провести анализ на наличие слюны в пятнах на вещественных доказательствах, но имеет один существенный недостаток — дает ложноположительный результат с окрашенными кровью либо предметом-носителем вытяжками. Поэтому его целесообразно использовать для предварительного скрининга исследуемого материала. Результаты исследования представлены в табл. 1. При получении положительной реакции (наличии амилазы в исследуемых пробах) мы наблюдали значительный рост оптической плотности с 0,044 (отрицательный контроль) до 1,817 условных единиц (жидкая слюна человека в разведении 1:100).

Результаты исследования по методу Каравея представлены в табл. 2. При получении положительной реакции (расщепления крахмала амилазой) мы наблюдали снижение оптической плотности с 0,416 (отрицательный контроль) до 0,061 условных единиц (жидкая слюна человека в разведении 1:100).

Порогом чувствительности обеих методик был определен нами как разведение жидкой слюны 1:3000. Такой же порог чувствительности имеет реакция, предложенная А. Л. Федоровцевым по литературным данным. Метод Каравея имеет смысл использовать для этой же цели в окрашенных кровью либо предметом-носителем вытяжках, так как регистрация результатов происходит при другой длине волны. В тех объектах, где получен положительный результат на присутствие а-амилазы, следует провести повторный анализ на доказательное наличие слюны по Федоровцеву, либо иммунохроматографическим методом RSID™ Saliva.

Таким образом, на основе выполненного исследования можно заключить, что оба метода установления наличия слюны в пятнах на вещественных доказательствах с помощью наборов определения активности а-амилазы в биологических жидкостях, как «Амилаза-Ново-1», так и по Каравею «АМИЛАЗА-ОЛЬВЕКС», обладают возможностью объективной регистрации и компьютерной обработки результатов, отличаются воспроизводимостью, высоким качеством и низкой стоимостью реагентов, требуют всего 5 мкл водного экстракта, что позво-

ляет в этих же вытяжках устанавливать наличие крови и спермы.

Вышеизложенное позволяет рекомендовать данные методы для внедрения и широкого использования в экспертной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барсегянц Л. О.* Об определении наличия слюны в пятнах // МЗ СССР. — 1961.

2. *Томилин В. В., Барсегянц Л. О., Гладких А. С.* Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. — М.: Медицина, 1989. — 303 с.

3. *Туманов А. К.* Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. — М.: Госюриздат, 1961. — 576 с.

4. *Туманов А. К.* Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. — М.: Медицина, 1975. — 407 с.

5. *Федоровцев А. Л.* О модификациях методики определения слюны в следах на вещественных доказательствах по амилазной активности. — М, 1998. — 4 с.

6. *An J. H., Shin K. J., Yang W. I., Lee H. Y.* Body fluid identification in forensics // BMB Rep. — 2012. — Vol. 45. — № 10. — P. 545—553.

7. *Barni F., Berti A., Rapone C., Lago G.* Alpha-amilaze kinetic test in bodily single and mixed stains // J. Forensic Science. — 2006. — Vol. 51. — № 6. — P. 1389—1396.

8. *Hafkensheid J. C.* Results by the Phadebas amylase test for human sera in the presence and absence of albumin // Clin. Cheme. — 1978. — Vol. 24. — № 11. — P. 2061—2062.

9. *Keating S. M., Higgs D. F.* The detection of amylase on swabs from sexual assault cases // Forensic Sci. Int. — 1994. — Vol. 34. — № 2. — P. 89—93.

10. *Quarino L., Dang Q., Hartman J., Movnihan N.* An ELISA method for the identification of salivary amylase // J. Forensic Science. — 2005. — Vol. 50. — № 4. — P. 873—876.

11. *Satz N., Fuhrer I., Inabnit K. et al.* Diagnostic value of a diagnostic strip for determining urinary amylase // Schweiz. Rundsch. Med. Prax. — 1989. — Vol. 28. — № 13. — P. 368—371.

12. *Troger H. D., Schuck M., Tutsch-Bauer E.* Detection of saliva traces using test strips // Forensic Sci. Int. — 1984. — Vol. 25. — № 2. — P. 143—146.

13. *Uldall A.* Visual tests for urinary amylase investigated in routine laboratory // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1985. — Vol. 45. — № 2. — P. 189—192.

РЕЗЮМЕ

В. Л. Сидоров, О. Д. Ягмуров, А. В. Коноваленко

Преимущества применения колориметрических экспресс-методов для установления наличия слюны в пятнах, следах и участках на вещественных доказательствах

Проведен анализ опыта как отечественных, так и зарубежных авторов по применению методик установления наличия слюны на вещественных доказательств. Представлены две колориметрические модификации методик, предназначенных для ориентировочного установления наличия слюны в пятнах, следах и участках на вещественных доказательствах. Предложенная нами модификация сопровождается фотометрическим учетом и компьютерной обработкой результатов. Широко раскрываются производительность, объективность, а также другие возможности и преимущества данных методов при использовании их в судебно-медицинской практике.

Ключевые слова: наличие слюны, вещественные доказательства, судебно-медицинская практика.

SUMMARY

V. L. Sidorov, O. D. Yagmurov, A. V. Konovalenko

Advantages of application of colorimetric express methods to establish the presence of saliva in stains, traces and sites on the material evidences

The article analyzes the experience of both native and foreign authors ofthe application of the techniques allowing forestablishment of presence of saliva on the evidences. Two colorimetric modifications of the techniques designed to establish the existence of indicative saliva stains, traces and sites on the material evidences are presented. The proposed modification is accompanied by photometric accounting and computer processing of the results. Performance, objectivity, as well as other features and advantages of these methods when used in forensic practice are described in detail.

Keywords: presence of saliva, material evidences, forensic practice.