

УДК 577.213/217.088

**ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ
ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНОГО ТЕСТУ «CITO TEST FECAL OCCULT BLOOD»
ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ НАЯВНОСТІ ТА ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ
СЛІДІВ КРОВІ НА РЕЧОВИХ ДОКАЗАХ
ПРИ ПРОВЕДЕННІ КОМПЛЕКСНОЇ СУДОВО-МЕДИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

Кривда Р.Г., Ющук К.М.

Одеський національний медичний університет

Стоєва М.І.

Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи

Досліджено можливість застосування імунохроматографічного тесту «Cito Test Fob» при комплексному судово-медичному дослідженні шляхом визначення його чутливості відносно різних концентрацій гемоглобіну та специфічності відносно крові людини. Проаналізовано вплив фактору характеру поверхні, що містить сліди крові, та фактору давності нанесення слідів на результативність методу. Оцінена можливість позитивного результату тесту при роботі із застарілими плямами крові. Результати дослідження показали, що «Cito Test Fob» є чутливим та специфічним методом, який дозволяє в короткий термін встановити наявність та виду приналежності слідів крові. Враховуючи економічну доступність та зручність у використанні даного тесту, його можна рекомендувати для скринінг-дослідження слідів, що схожі на кров, як в умовах місця події, так і в лабораторних умовах, для скорочення терміну проведення комплексного судово-медичного дослідження речових доказів зі слідами крові.

Ключові слова: судово-медичне дослідження, Cito Test Fob, імунохроматографія, гемоглобін, сліди крові.

Постановка проблеми. Проведення сучасної комплексної судово-медичної експертизи речових доказів, на яких є біологічний матеріал людського походження, складається з декількох етапів, які проводяться за допомогою судово-медичних імунологічних, судово-медичних цитологічних та судово-медичних молекулярно-генетичних методів у відповідних відділеннях бюро судово-медичної експертизи [1]. На першому етапі судово-медична експертиза речових доказів вирішує питання про природу та походження біологічного матеріалу від людини, потім здійснюється ідентифікація

об'єктів за допомогою біохімічних та генетичних маркерів.

У зв'язку з тим, що експертиза слідів крові займає перше місце в структурі дослідження біологічних об'єктів, саме питання дослідження слідів крові є актуальним на сьогоднішній день.

Одним з етапів проведення сучасної комплексної судово-медичної експертизи речових доказів, що містять сліди, схожі на кров, є встановлення наявності крові та її видової приналежності.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На сьогоднішній день найбільш поширеним методом встановлення наявності крові, що базується

на виявленні гемоглобіну, є метод тонкошарової хроматографії. Однак застосування цього методу вимагає проведення другого етапу дослідження для встановлення виду знайденої крові. На виконання цих етапів витрачається багато часу та ресурсів (людських, матеріально-технічних). Крім того, при застосуванні методу тонкошарової хроматографії може бути отриманий негативний результат за умови впливу на плями крові різноманітних хімічних та фізичних факторів. При дослідженні мікрослідів, за умови застосування тонкошарової хроматографії, може не залишитися матеріалу для проведення подальших етапів судово-медичного дослідження. Тому дуже актуальним є пошук методів для дослідження слідів крові, котрі дозволять одночасно встановити як наявність крові, так і її виду належність, зберігаючи тим самим матеріал для подальшого ідентифікаційного дослідження та дозволяючи скоротити загальний час проведення експертизи.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. У якості методу, що відповідає вищенаведеним вимогам, виступає імунохроматографічний метод з використанням тест-касет SERATEC HemDirect, який призначений спеціально для судово-медичного аналізу і дозволяє виявити у слідах крові гемоглобін людини. У 2016 році нами проводилися дослідження по використанню вищеназваного тесту, надані відповідні рекомендації щодо його застосування при дослідженні речових доказів, результати яких опубліковані [2]. Однак, середня вартість одного набору SERATEC HemDirect з тридцяти тестових касет в Україні складає 100,0 євро, тобто вартість дослідження одного біологічного об'єкту складає близько 3 євро – 90,0 гривень. Середня кількість об'єктів – слідів крові, досліджених по одній експертизі, складає 5-7 одиниць, при цьому дослідження слідів, схожих на кров, теж може бути до 5 одиниць, в цілому необхідно використати на одну експертизу до 10-15 тестових пластинок, вартість яких буде складати від 900,0 до 1500,0 гривень. В економічному сенсі, на сьогоднішньому етапі фінансування експертних установ, використання набору SERATEC HemDirect дуже коштовне. Внаслідок чого нами було проведено пошук аналогічних методів та способів, які можливо використовувати для дослідження слідів крові на речових доказах.

Сьогодні в Україні для використання в клінічній практиці зареєстрований імунохроматографічний тест для визначення прихованої крові у калі – CITO TEST Fecal Occult Blood (FOB) виробництва CerTest, Іспанія, вартість якого складає близько 50 гривень. Його розроблено для швидкого аналізу калу на приховану кров. Принцип тесту полягає у специфічній взаємодії антигену людського гемоглобіну і мишачих моноклональних антитіл до нього на хроматографічній мембрані з рідиною досліджуваного зразка. Cito Test Fob виявляє непошкоджений та пошкоджений людський гемоглобін, пороговий рівень чутливості тесту за даними виробника складає 50 нг/мл.

Мета статті. Метою роботи була оптимізація проведення комплексної судово-медичної експертизи речових доказів зі слідами крові на етапі судово-медичного імунологічного дослідження за рахунок застосування імунохроматографіч-

ного тесту «Cito Test Fob» для наступної ідентифікації цих слідів за допомогою молекулярно-генетичних методів. Для досягнення мети ми вирішили наступні задачі:

1. Визначили параметри чутливості та специфічності тесту «Cito Test Fob»;
2. Дослідили вплив найбільш суттєвих екзогенних факторів на результативність тесту «Cito Test Fob».
3. Дослідили можливість використання тесту «Cito Test Fob» для дослідження «старих» плям крові.

Матеріали та методи. На першому етапі дослідження визначали параметри чутливості тест-системи «Cito Test Fob» відносно концентрації людського гемоглобіну, для чого використовували розчини останнього в концентрації 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 16,5, 8,25, 4,13, 2 та 1 мкг гемоглобіну/мл. Для тестування кожного розведення була використана індивідуальна тестова смужка. На тестову ділянку кожної з 10 смужок наносили по 5 крапель (150 мкл) відповідного розведення гемоглобіну. Результат реєстрували на десятій хвилині відповідно до інструкції виробника. Контрольне дослідження проводили з кількістю розведень, що залишилися, за допомогою стандартних судово-медичних імунологічних методів, а саме методу тонкошарової хроматографії та реакції преципітації в агарі (РПА). Тонкошарову хроматографію проводили з використанням пластинок «Сорбфіл ПТСХ П-А 100x100». Пластинку поділяли на 10 смужок. Пробу наносили капіляром у такій кількості, щоб зона старту складала 2 мм. Розгонку проводили впродовж 15 хв, після чого хроматограми прогрівали у сушильній шафі до 115°C і проводили їх проявлення за допомогою спиртового розчину бензидину і 3% розчину перекису водню. Для проведення РПА готували 1% агарозний гель, який поміщали шаром 4 мм на чашки Петрі. В центральній лунці кожної чашки розміщували по 1 краплі екстрагованої витяжки з відповідного сліду, а в периферійних лунках – по 1 краплі преципітуючих сироваток людини, kota, свині, собаки, рогатої худоби, коня, кролика. Результати реакції оцінювали через 24 години інкубації у холодильнику.

Встановлення специфічності тесту проводили з розчинами рідкої крові людини, кішки, собаки, свині, великої рогатої худоби (корови) та птиці (курки) в розведеннях 1:1000. Отримані розчини відповідних зразків крові по 5 крапель (150 мкл) наносили на індивідуальні тестові смужки. Результат реєстрували на десятій хвилині відповідно до інструкції виробника.

На другому етапі дослідження вивчали вплив різноманітних факторів на результативність тесту. В ході дослідження вивчали вплив двох груп факторів: фактору часу (давність нанесення слідів) та фактору характеру поверхні, на якій розташовані сліди. Дослідження проводили з інтервалом 1 тиждень (на 1-й, 7-й, 14, 21 та 28 день дослідження) впродовж 4х тижнів. Температура зовнішнього повітря складала 6-9°C з коливаннями 2-3°C, при відносній вологості від 75 до 94%. Для дослідження зразки рідкої крові у кількості 0,1 мл наносили на зовнішні поверхні будівлі, а саме: пластикове підвіконня, металеві решітки та стіну з цементним покриттям.

Сукупність зразків крові на кожній з поверхонь складалася з 2-х груп зразків – тестової та контрольної, які маркувалися таким чином, щоб по 1 зразку з кожної групи підпадало під 1 тиждень дослідження. У тестовій групі встановлення наявності та видової приналежності крові проводили за допомогою експериментального методу тесту «Cito Test Fob», у контрольній – встановлювали наявність крові за допомогою стандартного методу тонкошарової хроматографії та видову належність за допомогою реакції преципітації в агарі (РПА). Відбір зразків з підвіконня та металеві решітки кожного тижня проводили шляхом змиву за допомогою ватного тампону, змоченого фізіологічним розчином, відбір зразків зі стіни з цементним покриттям робили шляхом зішкребу ділянок, на яких містились сліди крові.

Тампони зі зразками переносили у пробірки типу «епендорф» з додаванням до експериментальної групи зразків буфера з набору тесту «Cito Test Fob», а до контрольної групи – фізіологічного розчину. Далі сліди крові екстрагували при температурі 22°C протягом 30–60 хв. По 5 крапель (150 мкл) кожного з екстрагованих розчинів тест-групи наносили на тестову ділянку відповідної тест-смужки «Cito Test Fob». Результат реєстрували на десятій хвилині відповідно до інструкції. У контрольній групі зразків екстраговані розчини використовували для проведення тонкошарової хроматографії та реакції преципітації в агарі. Результати реакції оцінювали через 24 години інкубації у холодильнику.

На третьому етапі вивчали можливість використання тесту «Cito Test Fob» для дослідження «старих» плям крові, для цього проводили дослідження з використанням «старих» плям крові на марлі, які зберігалися в архіві Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи протягом 5-, 10- та 15-річного терміну. З ділянок марлі, що містили сліди крові, робили вирізки, які поміщали у пробірки типу «епендорф» з додаванням буфера набору тесту «Cito Test Fob», який входить до складу набору. Екстрагування проводили при температурі 22°C на протязі 30 хв., 1, 6, 12 та 24 годин для найкращого виходу гемоглобіну у буфер набору «Cito Test Fob».

Результати. При визначенні параметрів чутливості тесту «Cito Test Fob» позитивний результат на наявність людського гемоглобіну був отриманий при концентрації гемоглобіну в розчині 8.25 мкг/мл, у той час при використанні стандартного методу тонкошарової хроматографії позитивний результат на наявність крові – гемоглобіну був отриманий при концентрації гемоглобіну 2,0 мкг/мл. При встановленні видової приналежності гемоглобіну в концентрації 2,0 мкг/мл за допомогою реакції преципітації були отримані негативні результати.

Стандартний метод тонкошарової хроматографії на наявність крові виявився більш чутливим чим тест «Cito Test Fob», однак при вищезазначених концентраціях гемоглобіну, видова приналежність гемоглобіну не була встановлені, що не дає законної підстави на подальші експертні дослідження.

Таким чином, експериментально, на зразках людського гемоглобіну був встановлений пороговий рівень чутливості тесту «Cito Test Fob», який

складає 8.25 мкг/мл. Ми вважаємо, що саме така чутливість тесту «Cito Test Fob» достатня для проведення судово-медичних експертних досліджень слідів крові.

При визначенні специфічності тесту «Cito Test Fob» зі зразками рідкої рідкої крові людини, кішки, собаки, свині, великої рогатої худоби (корови) та птиці (курки) в розведеннях 1:1000, позитивний результат неодноразово був отриманий тільки з розчинами рідкої крові людини, що свідчить про достатню чутливість та специфічність тесту.

При дослідженні впливу факторів часу, а саме давності нанесення слідів крові на протязі чотирьох тижнів, зовнішніх умов (відносної вологості, зовнішньої температури) та характеру поверхні, на якій розташовані сліди (пластикові підвіконня, металеві решітки та стіну з цементним покриттям) було встановлено, що позитивний результат на встановлення наявності людської крові за допомогою тесту «Cito Test Fob» був отриманий з експериментальними слідами крові на протязі всіх 4х тижнів при вищезазначених умовах на поверхні металеві решітки та стіни з цементним покриттям. Негативний результат був отриманий на 14 день з експериментальними слідами крові на пластиковому підвіконні. Аналогічні результати були зафіксовані у контрольній групі при дослідженні експериментальних слідів крові.

Таким чином, було встановлено, що результативність тесту «Cito Test Fob» при дослідженні експериментальних слідів крові людини впродовж чотирьох тижнів з урахуванням впливу зовнішніх умов та характеру поверхонь не поступається стандартним судово-медичним імунологічним методам дослідження слідів крові, що дає можливість вважати його придатним для встановлення приналежності слідів крові, які знаходилися в умовах зовнішнього середовища на різних поверхнях на протязі чотирьох тижнів.

В результаті проведеної роботи при дослідженні «старих» слідів крові людині з терміном зберігання 5, 10 та 15 років при використанні тесту «Cito Test Fob» позитивні результати були отримані для всіх досліджуваних зразків. Слід підкреслити, що час екстракції слідів «старої» крові з лізуючим буфером, який входить до складу тесту, треба подовжувати до 24 годин, це дає найкращий результат.

Обговорення. Отримані нами результати продемонстрували, що імунохроматографічний тест «Cito Test Fob» є чутливим та специфічним методом встановлення наявності та видової приналежності.

Отримані нами результати продемонстрували, що імунохроматографічний тест «Cito Test Fob» є чутливим і специфічним методом для встановлення наявності та видової приналежності змінених та «старих» слідів крові, тому його можна рекомендувати для скринінг-дослідження слідів, які схожі на кров, як в умовах місця події, так і в лабораторних умовах для скорочення терміну проведення комплексного судово-медичного дослідження речових доказів зі слідами крові.

З урахуванням отриманих результатів можемо виділити наступні переваги даного методу:

– Скорочення терміну етапу судово-медичного імунологічного дослідження за рахунок засто-

сування імунохроматографічного тесту «Cito Test Fob» до 24 годин;

- Одночасне встановлення наявності та видової приналежності слідів крові;
- Можливість одночасного дослідження великої кількості слідів, що схожі на кров;
- Економічність методу в порівнянні зі стандартними методиками;
- Економність витрат біологічного матеріалу на етапі одночасного встановлення наявності та видової приналежності слідів крові;
- Можливість застосування безпосередньо на місці події;
- Проста процедура виконання, яка не потребує спеціальних вмій і навичок, а також зручна та об'єктивна інтерпретація результатів;

- Чутливість відносно стандартних методів;
- Можливість документування результатів дослідження;

– Можливість застосування тесту при відборі речових доказів, що містять сліди крові на етапі лабораторного дослідження.

Висновок. Імунохроматографічний тест «Cito Test Fob» можна рекомендувати для скринінг-дослідження слідів, що схожі на кров, як в умовах місця події, так і в лабораторних умовах, що дає можливість скоротити термін проведення комплексного судово-медичного дослідження речових доказів зі слідами крові на етапі судово-медичного імунологічного дослідження, для наступної ідентифікації цих слідів за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Список літератури:

1. Судово-медичне дослідження речових доказів. Г. Ф. Кривда, А. П. Дем'янчук, В. О. Котельникова, Р. О. Старовойтова і др. Херсон: Наддніпряночка, 2014. – 460 с.
2. Кривда Р. Г. Современные возможности идентификации следов крови. Р. Г. Кривда, Е. Н. Ющук // матеріали науково-практичної конференції «Особливості модернізації предмету досліджень представників медичних наук». Київ, 3-4 червня 2016. – С. 57-60.

Кривда Р.Г., Ющук Е.Н.

Одесский национальный медицинский университет

Стоева М.И.

Одесское областное бюро судебно-медицинской экспертизы

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА «CITO TEST FECAL OCCULT BLOOD (FOB)» ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ И ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЛЕДОВ КРОВИ НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСНОЙ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Аннотация

Исследована возможность применения иммунохроматографического теста «Cito Test Fob» при комплексном судебно-медицинском исследовании путем определения его чувствительности относительно различных концентраций гемоглобина и специфичности относительно крови человека. Проанализировано влияние фактора характера поверхности, содержащей следы крови, и фактор давности нанесения следов на результативность метода. Произведена оценка возможности положительного результата теста при работе со «старыми» пятнами крови. Результаты исследования показали, что «Cito Test Fob» является чувствительным и специфичным методом, который позволяет в краткие сроки установить наличие и видовую принадлежность следов крови. Учитывая экономическую доступность и удобство в использовании данного теста, его можно рекомендовать для скрининг-исследования следов, похожих на кровь, как в условиях места происшествия, так и в лабораторных условиях, для сокращения сроков проведения комплексного судебно-медицинского исследования вещественных доказательств со следами крови.

Ключевые слова: судебно-медицинское исследование, Cito Test Fob, иммунохроматография, гемоглобин, следы крови.

Kryvda R.G., Yushchuk K.M.

Odessa National Medical University

Stoieva M.I.

Odesa Regional Bureau of Forensic Medical Examination

**INVESTIGATION OF POSSIBILITY OF APPLICATION
OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST «CITO TEST FECAL OCCULT BLOOD
(FOB)» FOR THE PURPOSE OF DETERMINATION OF PRESENCE
AND SPECIES AFFILIATION OF BLOOD TRACES ON MATERIAL EVIDENCES
UNDER THE COMPREHENSIVE FORENSIC MEDICAL STUDY**

Summary

In our study, we have investigated the possibility of application of immunochromatographic test «Cito Test Fob» under the comprehensive forensic medical study via determination of its sensitivity depending on different concentrations of hemoglobin and specificity relating to the human blood. The surface factor, and also term of exposure factor have been analyzed to influence on the effectiveness of test. The possibility of positive result has been estimated using the samples of aged blood stains. The obtained results have shown that «Cito Test Fob» is revealed to be sensitive and specific method, allowing the prompt determination of presence and species affiliation of blood traces. Taking in consideration affordability and easy usage, we can recommend this test for the preliminary investigation of blood-like traces under conditions of scene or laboratory to reduce the total time of comprehensive forensic medical study of material evidences, which contain blood traces.

Keywords: forensic medical investigation, Cito Test Fob, immunochromatography, hemoglobin, blood traces.