



МИНИСТЕРСТВО
ВНУТРЕННИХ ДЕЛ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МВД России)

Экспертно-криминалистический
центр

125130, Москва, З. и А. Космодемьянских, 5

03.05.2006г. № 37/14 – 2031

На № _____ от _____

О направлении результатов
апробации

Направляю результаты апробации реагентов и материалов
“BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” и “HEXAGON OBTI”,
производимых компанией Bluestar®.

Приложение: на 16 листах.

Заместитель начальника

А.Ю. Семенов



Результаты апробации реактивов и материалов компании “BLUESTAR”

Обнаружение следов крови нередко представляет трудность, так как преступник часто пытается замывать или уничтожить их. Со временем кровь в пятнах изменяет цвет, и они вместо красных становятся буро-коричневыми, иногда почти черными или приобретают зеленоватый оттенок, что затрудняет их обнаружение. Пятна крови также трудно различимы на тканях и других предметах, окрашенных в темные тона (1).

Реакция хемолуминесценции, как ориентировочный (предварительный) метод установления наличия крови на исследуемом объекте, рекомендуется для выявления крови при осмотре плохо освещенных участков места происшествия большой площади. В ЭКП МВД РФ широко используют метод хемолуминесценции люминола. Раствором обрабатывают в темноте предметы, подозреваемые на наличие на них крови. Если раствор люминола попадает на кровь, то наблюдается свечение голубого цвета, которое длится, не менее 60 сек (реакция хемолуминесценции). Обработка биологического материала люминолом затрудняет в дальнейшем определение в нем групповой принадлежности крови серологическими методами (2).

В связи с этим возникает необходимость в поиске методик, которые откроют новые возможности экспертного исследования объектов биологического происхождения – следов крови.

На базе отдела экспертиз биологических объектов ЭКЦ МВД России в период времени с 03.02.06г. по 21.04.06г. была проведена апробация реактивов и материалов, производимых компанией “BLUESTAR”: “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”, принцип работы этого реактива основан на реакции хемолуминесценции и “HEXAGON OBTI” – иммунохроматографического теста.

Для проведения наиболее объективного исследования была предложена модель реальной экспертизы. Подготовкой “вещественных доказательств” занимался один эксперт-биолог, а их исследованием другой. Был поставлен вопрос: “Имеется ли на предоставленных на исследование объектах (шерстяные перчатки и нож) кровь, если да, то является ли она кровью человека и какова ее групповая принадлежность, ДНК-формула? Могла ли данная кровь произойти от “подозреваемого” или “потерпевшей”?”.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработчики реактива “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” обращают особое внимание экспертов на возможное воздействие загрязнений с объектов исследования, а именно детергентов различной природы, с реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”. Для того чтобы проверить вероятность такого нежелательного воздействия, на поверхность перчаток был нанесен образец широко используемого бытового химиката (место нанесения для исследователя было не известно), а металл подвергнут коррозии.

Для получения наглядных результатов мы провели цифровое фотографирование объектов до, и после обработки реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”. При этом учитывали рекомендации производителя реактива относительно техники фотографирования и степени затемнения объектов исследования.

Применение в экспертной практике анти-гемоглобиновых (анти-Hb) сывороток, дало возможность получения препаратов многоцелевого использования: для одновременного установления наличия и видовой принадлежности крови, без проведения дополнительного исследования (3). Все объекты, давшие положительный результат с реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” были протестированы иммунохроматографическим тестом “HEXAGON OBTI”, одним из современных вариантов данной методики. Этот инструмент позволяет специфически выявлять кровь человека, то есть он в отличие от “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” является доказательным, а не предварительным методом установления наличия крови.

Полученные с использованием реактивов компании “BLUESTAR” результаты проходили обязательную проверку с применением традиционных, широко используемых в экспертной практике доказательных методов: установление наличия крови методом микролюминесценции и методом тонкослойной хроматографии (2). Так как реакция хемолюминесценции является ориентировочным (предварительным) методом, то необходимо было проверить возможность применения доказательных методов после использования реактива “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”. Одновременно проводилось установление видовой принадлежности крови с использованием диагностических преципитирующих сывороток производства РАО “Биопрепарат”.

Объекты, в которых была выявлена кровь человека, были направлены на исследование групповых антигенов по системе ABO. Известно, что обработка люминолом затрудняет в дальнейшем определение групповой принадлежности крови серологическими методами (2), поэтому необходимо было убедиться в отсутствии отрицательных побочных эффектов при использовании в работе “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”.

Одним из наиболее современных методов установления личности человека является молекулярно-генетическая идентификация, основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР) – специфическом синтезе фрагментов ДНК *in vitro*. Этот процесс может ингибироваться веществами различной природы (4). Поэтому заключительным этапом наших исследований было изучение ДНК объектов после их обработки реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ “ТРАДИЦИОННЫЕ” МЕТОДЫ

1. Установление наличия крови методом микролюминесценции

При действии крепких кислот на гемоглобин крови происходит его преобразование в гематопорфирин. Он является продуктом довольно глубокого распада гемоглобина – последней его ступенью, которую еще можно определить и считать достоверным признаком наличия крови (1). Выявление в УФ-лучах ярко-красной флюоресценции обработанного серной кислотой вещества является доказательным методом установления наличия крови. Метод требует использования люминесцентного микроскопа.

2. Установление наличия крови методом тонкослойной хроматографии

Широкое применение в практике судебно-биологической экспертизы для установления наличия крови получил метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), который относится к доказательным и является высокочувствительным методом определения наличия крови по гемоглобину при ее значительном разведении ($5 \cdot 10^{-8}$ мл) (2).

3. Установление видовой принадлежности крови методом иммунодиффузии в агаре

Известно несколько методов определения видовой принадлежности крови: реакция преципитации в жидкой среде (кольцепреципитация), иммунодиффузия в агарозном (агаровом) геле, встречный иммуноэлектрофорез и др. Эти методы основаны на иммунологической реакции преципитации, т. е. реакции, где соответствующие антигены и антитела образуют комплексы, которые выпадают в осадок.

4. Выявление антигенов А и В реакцией абсорбции-элюции (РАЭ)

Основной серологической системой, используемой для определения групповой принадлежности крови человека для целей судебно-биологической экспертизы, является система ABO.

Впервые реакция абсорбции-элюции была предложена в 20-е гг. XX в. В настоящее время она является самой применяемой при производстве судебно-биологических экспертиз (2).

5. Типирование локусов ДНК /локусы D8S1179; D21S11; D7S820; CSF1PO; D3S1358; TH01; D13S317; D16S539; D2S1338; Amelogenin; D5S818; FGA; D19S433; vWA; TPOX; D18S51/

ПЦР-методы базируются на образовании специфического продукта (амплификата) ферментом ДНК-полимеразой на специфической ДНК-матрице in vitro.

Для количественной и качественной оценки выделенной ДНК применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, используя набор реагентов «Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit». Реакцию амплификации и детекцию флуоресцентно меченых амплифицированных фрагментов проводили с помощью прибора "ABI Prism® 7000 Sequence Detection System».

Для исследования локусов мы применяли метод полимеразной цепной реакции, используя набор реагентов «AmpFlSTR® Identifier™». Разделение и детекцию флуоресцентно меченых амплифицированных фрагментов проводили на приборе «ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer». Все перечисленные выше реактивы и оборудование произведено фирмой «Applied Biosystems».

ВЫВОДЫ

Полученные результаты представлены в таблице:

Объект	“BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”	“HEXAGON OBTI”	“Традиционные” методы	Типирование локусов ДНК
Матерчатые перчатки	Интенсивное свечение продолжительностью около 10 сек. после обработки реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Tablets Latent bloodstain reagent” Сделали вырезки №№1-7	С вырезками №№1-5 получили положительный результат теста, а с вырезками №№6-7 отрицательный. Дальнейшее обсуждение все прояснило: вырезки №№6-7 – следы строительного лака	Исследования с использованием методов: микролюминесценции, ТСХ и методом иммунодиффузии в агаре подтвердили уже полученные результаты. Применение реакции абсорбции-элюции (РАЭ) позволило выявить антиген А, который присутствует в образцах крови “подозреваемого” и “потерпевшей”	Реакция амплификации прошла успешно, с большой эффективностью.
Нож	Ввиду предполагаемого малого количества крови, использовали реактив “BLUESTAR®FORENSIC Magnum Latent bloodstain reagent” Наблюдали интенсивное свечение продолжительностью около 5 сек. Сделали смыв с поверхности ножа №8.	Тест со смывом №8 показал отрицательный результат	После применения традиционных методов был сделан вывод: на ноже присутствует кровь животного (свиньи).	Типирование локусов не проводилось

Согласно результатам, представленным в таблице, можно сделать вывод о высокой эффективности применения “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” и “HEXAGON OBTI” для решения экспертных задач.

Взаимодействие реактива “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” со следами строительного лака, не является негативным моментом в работе эксперта, так как реакция хемоллюминесценции — это ориентировочный (предварительный) метод установления наличия крови на исследуемом объекте. Поэтому дальнейшим этапом работы должно быть применение доказательных методов, таких как, например иммунохроматографический тест “HEXAGON OBTI”, который позволил специфически выявить кровь человека в вырезках №№1-5. При этом в смыве №8, где присутствовала кровь животного (свиньи), результат был отрицательным.

Также была показана возможность определения групповой принадлежности крови серологическими методами после обработки вещественных доказательств реактивом “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent”. Это обстоятельство выгодно отличает реактивы компании “BLUESTAR” от широко используемого в ЭКП МВД РФ метода хемоллюминесценции люминола.

Отсутствие какого-либо ингибирующего воздействия со стороны компонентов реактива “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” на полимеразную цепную реакцию (ПЦР) является неоспоримым преимуществом данного метода. Наиболее эффективно его применение в работе с микроколичествами крови на объекте, когда необходимо получение достоверных результатов при минимальном расходе материала на исследование.

В качестве рекомендации производителю можно посоветовать наладить выпуск реактива “BLUESTAR®FORENSIC Latent bloodstain reagent” в более экономичной расфасовке. Учитывая опыт использования раствора люминола в экспертной работе можно утверждать, что необходимый объем люминесцирующей жидкости для разового осмотра места происшествия, как правило, составляет не более 50 мл.

Эксперт отдела экспертиз биологических объектов
ЭКЦ МВД России
старший лейтенант милиции

А. В. Мельников А.В. Мельников

Литература:

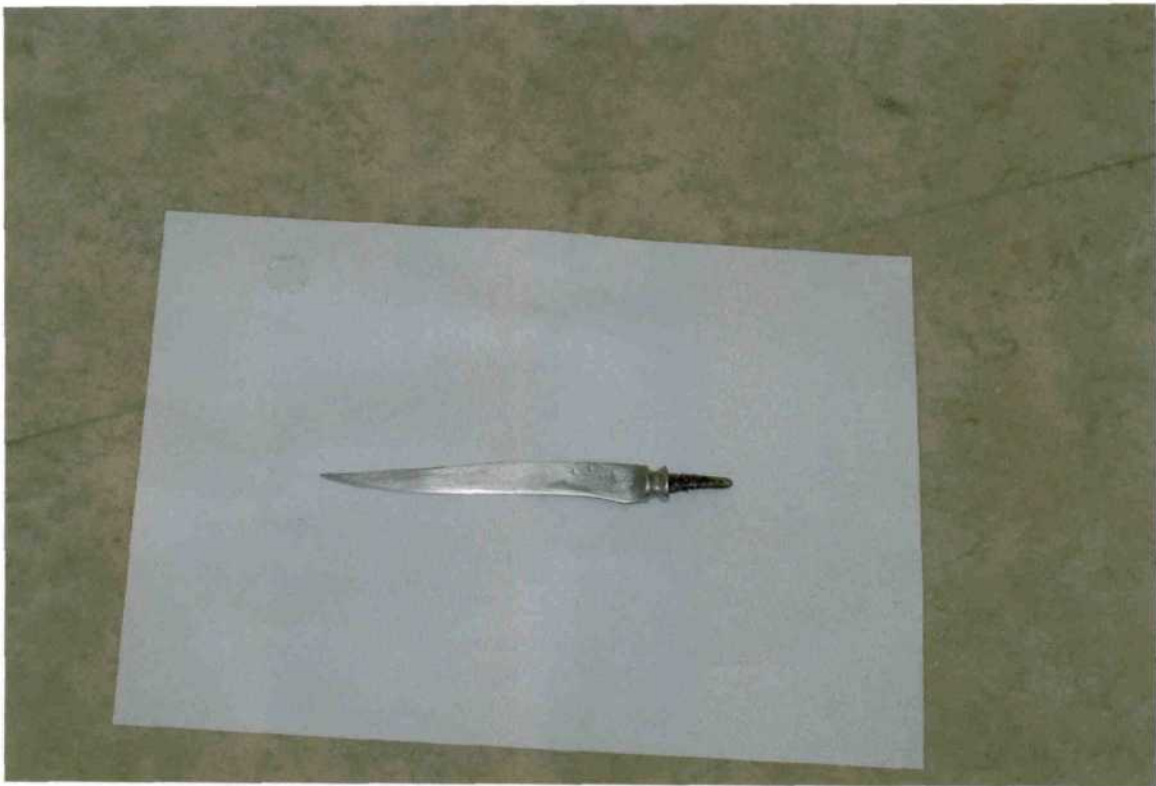
1. В.В.Томилин, Л.О.Барсенянц, А.С.Гладких Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. — Москва: Медицина, 1989 — С.8
2. М.Г. Пименов, С.А. Кондрашов, Л.С. Платоненкова и др. Экспертные методики исследования тканей и выделений человека. — Москва: ЭКЦ МВД России, 2006 — С.10
3. М.Г. Пименов, А.А. Рыбакова, А.В. Мельников “Опыт применения тестовых полосок фирмы “Seratec” (Германия) на гемоглобин крови человека и простатоспецифический антиген в экспертной практике”. — Москва: ЭКЦ МВД России, “Экспертная практика”, 1-е полугодие 2006г.
4. K.B. Mullis, F. Ferre, R.A. Gibbs, PCR. The Polymerase Chain Reaction. — Birkhauser, Boston, MA., 1994 — P.458



Вид объекта до обработки "BLUESTAR®FORENSIC Tablets Latent bloodstain reagent"



Вид объекта после обработки "BLUESTAR®FORENSIC Tablets Latent bloodstain reagent"



Вид объекта до обработки "BLUESTAR®FORENSIC Magnum Latent bloodstain reagent"



Вид объекта после обработки "BLUESTAR®FORENSIC Magnum Latent bloodstain reagent"

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
D1	1	Quantifiler Human	Unknown	27.50		3.83				
		IPC	Unknown	28.50						
D2	2	Quantifiler Human	Unknown	27.93		2.80				
		IPC	Unknown	26.83						
D3	3	Quantifiler Human	Unknown	28.14		2.40				
		IPC	Unknown	27.55						
D4	4	Quantifiler Human	Unknown	27.83		3.02				
		IPC	Unknown	27.24						
D5	5	Quantifiler Human	Unknown	26.70		6.92				
		IPC	Unknown	27.67						
D6	Criminal	Quantifiler Human	Unknown	28.77		1.50				
		IPC	Unknown	27.81						

