ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ НА АМИЛАЗУ В СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ С ПОМОЩЬЮ ЭКСПРЕСС ТЕСТА «MEDICAL TEST» В РЕСПУБЛИКЕ УЗБЕКИСТАН.

Хайдаров М.А.
Гулмирова.Б.У
РНПЦ СМЭ завудующий Чирчикского отделение Ташкентской области.
Студентка 4 курса Ташкентской Медицинской Академии Чирчикского филиала

Аннотация: *Судебная медицинская экспертиза в настоящее время обладает широким спектром методов исследования, такие как медицинская криминалистика, антропология, судебнобиологические и судебно-серологические исследования.*

Различные биологические образцы использовались для того, чтобы помочь экспертам получить ответы на множество вопросов в этой области.

В этой статье мы предлагаем для идентификации слюны методом экспресс-теста без буферной жидкости, который был разработан ООО «Medical Test» для проведения исследования идентификации слюны на месте происшествия, который значительно уступает по времени предварительной диагностики.

Ключевые слова. *Место происшествия, судебно - медицинская практика экспресс тестирование, амилаза, слюна*.

Актуальность проблемы:

На данный момент на рынке имеются различные тесты на наличие слюны, работающие с буферной жидкостью, помогающие идентифицировать компоненты образца слюны.

Так, предлагаемый метод обнаружения слюны на основе Polilight является портативным и недорогим. Однако этот метод показывает специфический цветной свет, который невозможно выявить при ярком фоне. Свет, излучаемый слюной, имитирует флуоресценцию других жидкостей организма, что может привести либо к ложной идентификации, либо к большему расходу времени, пока другие методы не подтвердят идентичность.

Тесты Phadebas и SALIgAE основаны на наличии α-амилазы, присутствующей в образцах слюны. Эти тесты просты в использовании, но

имеют недостатки в виде перекрестной реактивности, временной эффективности и потери образцов.

Вышеуказанные методы на наличие слюны с другими жидкостями организма могут давать ложноотрицательные результаты

А предлагаемый нами SAL IgAE с иммунохроматографическим тестом «Fast Test Medical™» Saliva (Узбекистан) на α-амилазу выявляет моноклональные антитела специфичные для слюны и флуоресцентной активности слюны, обеспечивая лучшую чувствительность на фоне и других примесей и меньшую затрату времени на месте происшествия.

После установления наличие слюны на вещественных доказательствах, последняя может быть основным источником для ДНК диагностики, для дальнейшего профилирования ДНК.

Цель исследования: Провести судебно-медицинский сравнительный анализ и тестирование тестов на быструю идентификацию пятен слюны между (RSID™-Saliva), портативным излучателем Polilight, тестом Phadebas и SAL IgAE и иммунохроматографическим тестом «Fast Test Medical™» Saliva (Узбекистан) на α-амилазу.

Материалы и методы исследования: объекты вещественных доказательств, являлись 78 клинических образцов (жидкость ротовой полости), ранее собранных у добровольцев.

Для сравнительного анализа использовали портативный аппарат «Polilight», тесты «Phadebas» и «SAL IgAE» и иммунохроматографический тест «Fast Test Medical™» Saliva

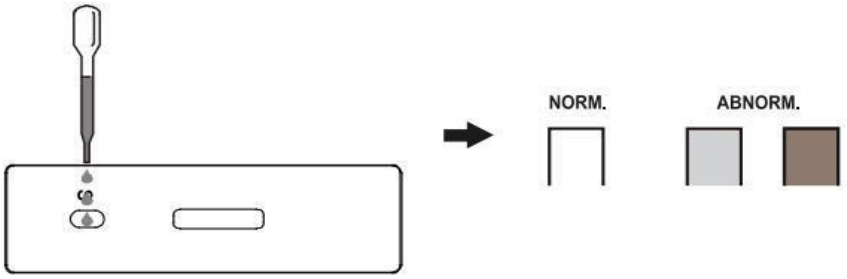
Современные методы биологической лабораторной экспертизы которые используют для установления наличие слюны, основаны на активности α-амилазы.

Нами было разработан иммунохроматографический-тест (Fast Test Medical^{tm} Saliva) на α – амилазу, который является высокочувствительным методом обнаружения α -амилазы в слюне. Этот тест обеспечивает предварительный скрининг. Лабораторный анализ можно применять к любому подозреваемому объекту и получить положительные результаты.

α-Амилаза может гидролизовать крахмал с образованием глюкозы, мальтозы и декстрина. Когда концентрация субстрата известна и избыточна, добавляется йод для соединения с негидролизованным крахмалом, после чего образуется комплекс коричневого цвета. Количество гидролизованного крахмала можно рассчитать по интенсивности коричневого цвета в смотровом окне теста.

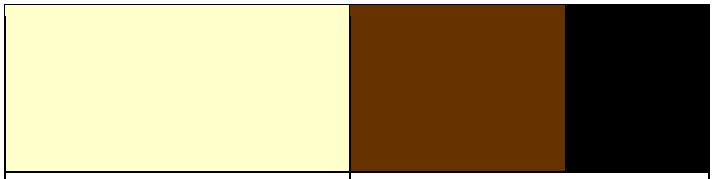
Для проведения теста и идентификации человеческой слюны необходимо иметь: образец (если сухой то развести дистиллированной водой) объемом не менее 0,2 мл в контейнер, этот же экстракт добавить 3 (три) капли

дистилированной воды (приблизительно 120 мкл) в лунку для образца (S) тестовой кассеты и сравнить проявившийся цвет в смотровом окне через 15 (пятнадцать) минут. Результаты получаются путем прямого сравнения напечатанных цветных блоков.



Цветограмма

Амилаза



Отрицательный	Положительный





Результаты и их обсуждение: Судебно-биологическая экспертиза вещественных доказательств имеет значимое место по раскрытию преступлений.

Мы подробно изучили тесты Fast Test Medical Saliva на чувствительность, специфичность биологических жидкостей, их видовую специфичность и стабильность. Кроме того, мы сравнили способность этих тестов обнаружить слюну человека из различных субстратов и поверхностей, которые обычно встречаются в судебно-медицинской лаборатории.

Следует отметить, что тест (RSID™) Saliva и Fast Test Medica™ Saliva не вступает в перекрустную реакцию с вагинальной жидкостью и спермой.

А минимальный предел обнаружения на амилазу тестом RSID™-Saliva (Chicago) и экспресс-тестом Fast Test Medical™ Saliva - 1 мкл человеческой слюны.

Если тест дает положительный результат, то, скорее всего, присутствует достаточно биологического материала для получения профиля ДНК.

Преимущество экспресс-теста Fast Test Medical™ Saliva на амилазу в том, что он не требует использования буферной жидкости.

Также было проведено параллельное сравнение с использованием экспресс-теста на амилазу и другим коммерческим тестом, а именно RSID™-Saliva для анализа амилазы. Тестирование проводилось на 78 клинических образцах (жидкость ротовой полости), ранее собранных у добровольцев.

Технический отчет по экспресс-тесту «Fast Test Medical™» (Saliva) на Амилазу

Метод		«RSID™» (Saliva)		Итого
	Результат	Положительный	Отрицательный	Результат
«Fast Test Medical™» (Saliva) AMY 2010004-T	Положительный	30	1	31
	Отрицательный	1	46	47
Итого результат		31	47	78

В этой таблице отмечен экспресс-тест «Fast Test Medical™» (Saliva) на Амилазу;

относительная чувствительность =30/31x100%=96,8% ✓

Относительная специфичность = 46/47×100% = 97,9%

Общее согласие =(30+46/31+47×100% = 97,4%

Аналитическая чувствительность

Было проведено исследование для проверки чувствительности реагентных полосок на экспресс-тесте на амилазу. Аналитическая чувствительность определялась путем добавления в образцы слюны, воду в концентрации 0, 25%, 50%, 75% и 100%. Стандарты амилазы были рандомизированы и закодированы. Всего было протестировано 30 повторов для каждого стандарта. Образцы визуально сравнивали по цвету реакционной подушки с цветовой шкалой через 5 минут после нанесения образца. Результаты представлены в таблице ниже: Экспресс тест кассета «Fast Test Medical™» (Saliva) Амилаза

Концентрация Амилазы	№ количество	Отрицательный	Положительный	Положительно в

				%
0%	30	30	0	0%
25%	30	29	1	3,33%
50%	30	5	25	83,3%
75%	30	0	30	100%
100%	30	0	30	100%

Таким образом, результаты сравнительного анализа показали минимальный уровень чувствительности экспресс-теста на уровне 50% концентрации амилазы, так как данные исследований показывают что, разбавление слюны водой по истечению срока (времени) показывали отрицательные результаты. (см.**таб№1**)

Результаты представлены в таблице ниже 50% ной амилазы. Таб№1

День	Лот №	1	2	3	4	5
1-й день	AMY 2201004 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201005 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201006 –T	отр	отр	отр	отр	отр
2-й день	AMY 2201004 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201005 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201006 –T	отр	отр	отр	отр	отр
3-й день	AMY 2201004 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201005 –T	отр	отр	отр	отр	отр
	AMY 2201006 –T	отр	отр	отр	отр	отр

При чувствительности на уровне 50% ной было проведена изменчивость (меж-/внутри/день-анализ)

При 50% концентрации слюны с водой, пять повторов каждого уровня ежедневного тестирования в течении 3-х последовательных дней с

использованием всех 3 партий. Сравнивались области реагентов с соответствующими цветными блоками на цветовой диаграмме в указанное время. При этом полоски близко к цветным блокам и тщательно сопостолялись.

Результаты представлены в таблице выше 50% амилазы. Таб №2

День	Лот №	1	2	3	4	5
1-й день	AMY 220100 4 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 5 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 6 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
2-й день	AMY 220100 4 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 5 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 6 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
3-й день	AMY 220100 4 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 5 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно
	AMY 220100 6 – T	положительно	положительно	положительно	положительно	положительно

Исследование интерферирующих веществ

Тест «Fast Test Medical™» слюна в достаточном количестве было обогащена различными аналитами, такими как, гемоглобин, триглицириды, билирубин. При этом исследовании были получено положительные результаты.

Также при добавлении к тест кассете «Fast Test Medical™» (Saliva) на амилазу капли чистой крови, спермы, грудное молоко человека, фекалии человека, слюна животных, моча человека без слюны , были получены отрицательные результаты.

Ускоренная стабильность экспресс-теста на амилазу оценивалась с использованием образцов из трех разных партий. Их помещали в инкубатор 192 дней с температурой, откалиброванной на 37 градусов. Относительная влажность (RH) была откалибрована на уровне около 60%. Серия тестов на стабильность была проведена через 0, 7, 14, 21, 28, 43, 58, 73, 103, 133, 148, 163, 178, 185, 192 дня при 37 градусов в соответствии с графиком Аррениуса.

Тестовые полоски были проанализированы с использованием каждой тестовой концентрации слюны при 0 (образцы воды), 50% и 100% образцах раствора слюны. Тестирование в каждом определенном временном интервале состояло из пяти повторов для каждого образца и считывания результата через 5 минут в соответствии с цветовой диаграммой.

Итог: Экспресс-тест на амилазу был стабилен при 37°C в течение 192 дней. Эти данные были нанесены на график Аррениуса, и срок годности этого продукта был определен как минимум 24 месяца по данным производителя.

Необходимо указать тест «RSID™» Saliva - RSID™TM-Saliva не вступает в перекрестную реакцию со спермой или вагинальной жидкостью и может легко и специфически обнаруживать слюну из собранных вагинальных мазков. Следует отметить, что мы продемонстрировали специфичность жидкости организма с использованием RSID™TM-Saliva только для тестируемых жидкостей

Специфичность RSID™TM-слюны: тестирование неродственных жидкостей организма. Для оценки потенциальной перекрестной реакции или ингибирования RSID™TMслюны, экстракты из жидкостей организма человека слюна, кровь, сперма и моча, приготовленные, как описано выше были протестированы на RSID™TM-слюне экстракты слюны, крови, спермы и мочи отреагировали, как и ожидалось, только экстракты слюны дали положительный результат. Комбинации экстрактов со слюной или без нее также были протестированы; только смесь, содержащая все четыре экстракта жидкостей организма, дала положительный сигнал (кровь, сперма, моча и слюна).

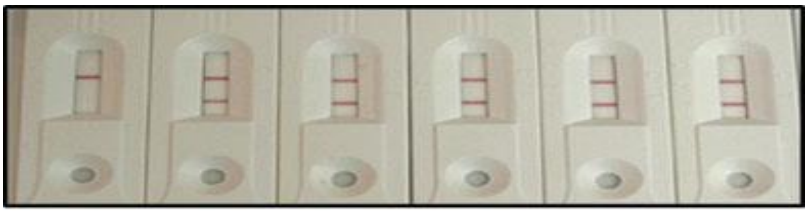
RSID™TM-Saliva дал слабый положительный результат с экстрактами, приготовленными из грудного молока человека.

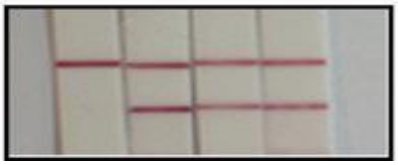
Сравнительная таблица жидкостей человеческого происхождения №1

Человеческая		Тест RSID™TM-Saliva	Тест Fast Test Medical™ - Saliva	Тест Screening test «Fadebass» - Saliva
1	Слюна	Слабо положительный	Положительно	Положительно
2	Моча	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
3	Грудное молоко	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
4	Кал	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
5	Пот	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
6	Сперма	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
7	Вагинальная жидкость	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный
8	Кровь	Слабо положительный	Отрицательный	Отрицательный

RSID™ Saliva Эффект высокой дозы крючка

Эффект высокой дозы крючка может вызывать ложноотрицательный результат на некоторых иммунохроматографических полосках с латеральным потоком, когда в исследуемом образце присутствуют высокие уровни целевого антигена. Ложноотрицательный результат из-за эффекта высокой дозы крючка возникает, когда количество целевого антигена в образце достаточно велико, что значительное количество целевого антигена остается несвязанным коллоидным золотым антителом в конъюгатной подушечке. Это наблюдение привело нас к более строгим тестам на эффект высокой дозы крючка, в которых концентрация экстракта положительного контроля была увеличена путем уменьшения объема экстракта с 1 мл до 400 мкл (в 2,5 раза более концентрированный), и, наконец, к извлечению тампона положительного контроля в 200 мкл для получения более концентрированного экстракта (в 5 раз более концентрированного, чем стандартный положительный контроль).





Принцип действия, чувствительность и специфичность этих тестов были испытаны и проверены в судебно-биологическом отделе НПЦСМЭ Республики Узбекистан.

В 2015 году МЗ Республики Узбекистан в соответствии со стандартом Д-2 «Стандартов судебно-медицинской экспертизы и осмотра» и «Инструкцией по выполнению действий по всем видам судебно-медицинской экспертизы» № ABY.D.150.2013 включена в инструкцию по выполнению действий, а применение данного метода показано для судебно-биологических экспертиз и исследований.

Эти тесты в основном производятся в Америке, в Германии, а в настоящее время производство этих тестов налажено и в Республике Узбекистан.

Данные тесты прошли повторную проверку на чувствительность, специфичность и достоверность в филиале РНПЦ СМЭ.

Заключение. На основе анализа проведенных исследований, можно сделать следующие выводы, что :

1. Метод экспресс тестирования для выявлении α- амизалы, который содержится в слюне при половых преступлениях, является единственным дополнительным - основным методом диагностики.
2. Экспресс-тстирование «Fast Test Medical™» (Saliva) на наличие α-амизалы человека в вещественных доказательствах можно считать надежным, чувствительным, специфичным, с его помощью можно получить результат за короткие сроки (за 15 минут);
3. Экспресс-тестирование «Fast Test Medical™» (Saliva) по чувствительности и специфичности не уступает с тестами RSID™-Saliva, Тест Screening «Fadebass» - Saliva - Амилаза.
4. При необходимости эти тесты можно использовать непосредственно и на местах происшествия;

Литература:

1. Pedersen AM, Bardow A, Beier Jensen S, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion.
Oral Dis 2002;8(3):117–29.
2. Robyt JF, French D. The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. J Biol Chem 1970;245(15):3917–27.
3. Merritt AD, Karn RC. The human alpha-amylases. Adv Hum Genet 1977;8:135–234.
4. Merritt AD, Rivas ML, Bixler D, Newell R. Salivary and pancreatic amylase: electrophoretic characterizations and genetic studies. Am J Hum Genet 1973;25(5):510–22.
5. Svensson B. Regional distant sequence homology between amylases, alpha-glucosidases and transglucanosylases. FEBS Lett 1988;230(1– 2):72–6.
6. Hao Y, Wang J, Feng N, Lowe AW. Determination of plasma glycoprotein 2 levels in patients with pancreatic disease. Arch Pathol Lab Med 2004;128:668–74.
7. Gaenssle RE. Sourcebook in forensic serology, immunology and biochemistry. Washington, DC: U.S. Department of Justice, 1983.
8. Lindberg T, Skude G. Amylase in human mil k. Pediatrics 1982;70(2):235–8.
9. Hegardt P, Lindberg T, Bзrjesson J, Skude G. Amylase in human milk from mothers of preterm and term infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1984;3(4):563–6.