

Современные возможности судебной биологии в исследовании следов спермы. Сообщение 1. Серологические методы исследования

ГУ «80 Центральная военная судебно-медицинская лаборатория»¹, Центральная судебно-биологическая лаборатория Государственной службы медицинских судебных экспертиз²

В работе представлен алгоритм исследования следов спермы на вещественных доказательствах от момента их обнаружения до групповой идентификации. Освещены предварительные и доказательные методы исследования, традиционные методики, позволяющие эксперту тщательно исследовать вещественные доказательства в сжатые сроки, такие как фитагглютинационный метод. А также эффективные методики, относительно недавно позаимствованные белорусскими судебными биологами у зарубежных коллег, а именно, высокочувствительные иммунологические тесты по определению простатического специфического антигена (PSA) в пятнах. Уделено внимание сложным вопросам групповой дифференциации антигенов в смешанных пятнах, вопросам сохранности сперматозоидов в половых путях женщин при жизни и посмертно.

Ключевые слова: исследование следов спермы на вещественных доказательствах, оперативные действия при осмотре места происшествия, ориентировочные методы, доказательные методы, иммунологические методы, сохранность сперматозоидов, исследование смешанных следов.

В последнее время, на фоне общего спада уровня правонарушений среди военнослужащих, удельный вес преступлений против половой неприкосновенности или половой свободы (ст. 166 УК РБ - изнасилование и ст. 167 УК РБ - насильственные действия сексуального характера) остается очень высоким. Так в 2003 году 15% , а в 2006 и 2007 годах - 26% судебно-биологических экспертиз, произведенных в Государственном учреждении «80-я Центральная военная судебно-медицинская лаборатория», были назначены в связи с участием военнослужащих в изнасилованиях и насильственных действиях сексуального характера, в том числе и в отношении несовершеннолетних.

Современное состояние судебно-биологической науки позволяет оказывать действенную помощь следственным органам в установлении истины. На службу следствию поставлены как традиционные цитологические и морфологические методы исследования, основанные на обнаружении сперматозоидов, так и последние достижения науки: иммунологические и генотипоскопические методы, позволяющие работать с микроследами биологического происхождения.

Целью данной публикации является систематизация представлений, прежде всего сотрудников правоохранительных органов, о возможностях судебной биологии в подготовке доказательной базы при расследовании половых преступлений.

Оперативные действия при осмотре места происшествия.

Каждый этап оперативно-следственных мероприятий требует глубокого осознания процессов, протекающих в следах биологического происхождения под влиянием окружающей среды, и возможных последствий неосторожных действий при проведении данных мероприятий, влекущих за собой изменение основных свойств

либо полное уничтожение объектов исследования ещё до направления их в лабораторию.

Лицу, непосредственно контактирующему с вещественным доказательством, необходимо помнить о высокочувствительных методах исследования (анализ ДНК) и принимать меры по предотвращению загрязнения объекта исследования собственным биологическим материалом: работать в одноразовых резиновых перчатках и маске.

Осмотр места происшествия в случаях совершения противоправных действий сексуального характера необходимо проводить при ярком естественном или искусственном освещении. Поверхности предметов и одежды рекомендуется осматривать в косопадающем свете с помощью криминалистической лупы, а также использовать переносные источники ультрафиолетового излучения «Флуотест», «Квадрат», «ОЛД-41», «УК-1», «КД 33-Л» для выявления следов подозрительных на сперму.

Выявления следов спермы на месте происшествия можно проводить с помощью реактива «Фосфотест», который нанесен на подложку специальной пластины. Поверх подложечного слоя на пластине имеется индикаторный слой, который перед выявлением следов следует смочить водой и прижать к краю исследуемого объекта. Появление через 20-30 секунд на подложке пятна яркой фиолетовой окраски указывает на присутствие фермента кислой фосфатазы, характерной для следов спермы. [2]. Данную реакцию можно использовать только как ориентировочную пробу, так как в других биологических объектах также могут находиться большие количества этого фермента, в то время как в сперме содержание кислой простатической фосфатазы иногда бывает весьма незначительным. При низкой активности фермента, а также при отсутствии его, результат нельзя считать достоверным и соответственно нельзя делать вывод об отсутствии спермы, так как фосфатаза, даже если она первоначально присутствовала на объекте в большом количестве, могла быть разрушена под действием внешних факторов. [1]

Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств.

На вооружении эксперта имеются предварительные и доказательные методы исследования. [10]

1. Целью предварительных (ориентировочных) методов исследования является нахождение пятен, похожих на сперму, которые затем подлежат обязательному морфологическому исследованию. Используются следующие ориентировочные методы исследования:

- осмотр невооруженным глазом или с помощью лупы (для пятен спермы характерен белесовато-серый, желтовато-серый цвет; извилистость краев; крахмальная плотность; на не впитывающих поверхностях могут быть корочки беловато-серого цвета);

- исследование в ультрафиолетовом свете. В сперме находятся вещества, которые обладают свойством светиться (флюоресцировать) в ультрафиолетовых лучах, причем в свежих пятнах спермы, после эякуляции, наблюдается желтовато-зеленая флюоресценция (за счет флавина, находящегося в плазме), все остальные пятна будут давать бледно-голубое свечение (за счет плазмы спермы). Но метод этот неспецифичен, поскольку такое же свечение дают многие вещества, в том числе биологические жидкости (слюна, моча, молоко), остатки стирального порошка, синтетические ткани и др. Иногда заведомые пятна спермы не флюоресцируют, если на предметах-носителях имеются красители, которые гасят флюоресценцию. [7]

- реакция с картофельным соком (или фитоагглютинационный метод).

Сущность реакции состоит в том, что картофельный сок агглютинирует эритроциты независимо от их групповой принадлежности, но наиболее отчетливо реагирует с эритроцитами группы $0\alpha\beta$. Присутствие спермы препятствует наступлению «картофельной» агглютинации (реакция задержки агглютинации).

Действующим началом картофельного сока, вызывающим фитагглютинацию, является витамин С (аскорбиновая кислота). Активным компонентом спермы, блокирующим агглютинирующее действие витамина С в реакции фитагглютинации, является тестостерон, который содержится в сперматозоидах и в семенной плазме. О присутствии спермы мы предполагаем, когда получаем полную, либо значительную задержку агглютинации.[9]

По этой реакции мы можем высказаться лишь о возможном присутствии спермы, а не о ее наличии, т.к. реакция не строго специфична (сперма жеребца, кобылье молоко, женское молоко также будут давать задержку агглютинации).

Данная реакция позволяет в течение одного рабочего дня исследовать большое количество объектов, исследовать которое морфологическим способом было бы затруднительно. Реакция с картофельным соком используется при экспертизе вещественных доказательств как метод поиска невидимых глазом пятен спермы, либо поиска спермы на вещественных доказательствах, сплошь пропитанных кровью или очень сильно загрязненных каким-либо другим веществом. [1]

2. Доказательные методы исследования. Доказательством семенного происхождения пятна может служить обнаружение клеточных элементов спермы - сперматозоидов или головок сперматозоидов, которые содержатся только в сперме, имеют весьма характерный вид (состоят из головки, шейки и хвоста), позволяющий уверенно отличать их от других морфологических элементов. Метод абсолютно специфичен.

Морфологическое исследование подразделяется на две группы:

- окраска сперматозоидов без извлечения их из пятна. Используются различные методы окраски (0,5% раствор эритрозина в 25% аммиаке по методу Корен-Стокиса; 1% раствор кислого фуксина и 1% раствор метиленового синего по методу Баэки; обработка концентрированной серной кислотой и др.) вырезок, взятых непосредственно из подозрительного пятна.

- окраска сперматозоидов после их извлечения из пятна.

Концентрированное извлечение сперматозоидов из пятна по методу Серапяна: из подозрительного пятна делают вырезки на площади около 1 см², которые экстрагируют, центрифугируют, затем из осадка готовят препараты, которые окрашивают и подвергают исследованию.

Существует также метод отпечатков на предметных стеклах, предложенный Девяткиной и Юдиной. Он применяется в случае отсутствия разрешения на проведение исследований, могущих повлечь полное или частичное уничтожение объектов (в соответствии со ст. 61 ч.3 УК РФ).

Морфологический метод исследования спермы, несмотря на свои положительные стороны, имеет и серьезные недостатки. Он чрезвычайно кропотлив: поиски сперматозоидов в пятнах на вещественном доказательстве нередко требует многих часов, а иногда и дней. Отрицательный результат исследования никогда не даёт эксперту полной гарантии отсутствия на вещественном доказательстве следов семенной жидкости. Кроме того, всегда остаётся неизвестным, обусловлен

отрицательный результат отсутствием сперматозоидов или же он объясняется тем, что эксперт не смог их отыскать из-за разрушения под влиянием каких-либо внешних воздействий, или азооспермией, олигоспермией, некроспермией. Эффективность морфологического метода во многом зависит от соблюдения правил забора материала на исследование.

Забор материала на исследование. При половых преступлениях или при подозрении на них изымают содержимое влагалища, прямой кишки и ротовой полости.

Содержимое влагалища берется на однослойный стерильный марлевый тампон, размером не более 5x5 см, накрученный на палочку. Тампон высушивают при комнатной температуре, упаковывают в чистую белую бумагу и помещают в маркированный пакет, который опечатывают. Одновременно в отдельном пакете направляется чистый тампон для контроля.

Перед забором содержимого прямой кишки кожа в области заднепроходного отверстия протирается чистой марлей для исключения попадания на тампон спермы в результате затекания. Марлевый тампон размером не более 5x5 см вводится в прямую кишку на глубину 3-6 см. Одновременно в отдельном пакете направляется чистый тампон для контроля.

Содержимое ротовой полости берется на однослойный стерильный марлевый тампон размером 5x5 см, которым протирают слизистую оболочку губ, щек, десен (особенно в области 8-х зубов, зубы); на другой аналогичный тампон берется содержимое лакун и миндалин. Одновременно в отдельном пакете направляется чистый тампон для контроля.

При наличии на кожных покровах потерпевших следов, подозрительных на сперму, их изымают путем смыва на марлю. Обязательно направление контрольного кусочка марли.

При исследовании тампонов и мазков с содержимым влагалища следует учитывать влияние микрофлоры женских половых путей на сперматозоиды. Микрофлора может либо частично разрушать сперматозоиды, отделяя хвост от комплекса головка-шейка, либо полностью их лизировать (растворять).

В эякуляте здоровых мужчин имеется граммположительная флора (стафилококки, энтеробактерии, микрококки), являющаяся представителем нормальной микрофлоры репродуктивной системы. Так называемый биофильм микрофлоры здоровых фертильных мужчин и его влияние на сохранность сперматозоидов, также имеет значение в судебно-медицинской практике. [5] К тому же, по данным российских исследователей, среди контингента жертв окончанных изнасилований ввиду некоторых их психосоциальных особенностей изначально имеет место высокий фон сексуально передаваемых инфекций: 41,5% из них перенесли трихомоноз, хламидиоз, гонорею, сифилис и т.д. [4] Протеолитическая активность специфической флоры очень высока.

Для судебных медиков представляет интерес вопрос о сохраняемости сперматозоидов в половых путях у женщин при жизни и посмертно. Зарубежные исследователи на большом материале установили, что сперматозоиды во влагалище сохраняются не более 7 суток после сношения. [2]

В органах трупа менее чем через 1 сутки активизируются аэробные бактерии, имеющиеся при жизни (кишечная палочка, протей, сенная палочка, кокки). Синегнойная палочка полностью разрушает сперматозоиды в пятнах, хранившихся во

влажной среде в течение 2 - 3 суток. При хранении пятен в сухом виде разрушение сперматозоидов, как правило, не наступает.

О длительных сроках сохранения спермы сообщалось в судебной-медицинской литературе, в основном в качестве казуистических наблюдений: во влагалище трупа она может сохраняться до 62 суток, во рту трупа - до 60 суток (в условиях препятствующих разложению тела) и на трусах, хранившихся в банке - до 1 года. Имеются сообщения о значительном количестве головок и хвостиков сперматозоидов, обнаруженных во влагалище трупа, захороненного в зимнее время, спустя 107 суток после смерти. Исследованиями, проведенными Дмитриевой О.А. (Российский центр судебной-медицинской экспертизы МЗ и СР РФ, Москва), доказано, что изменения в структуре сперматозоида во влагалище трупов, находившихся в оптимальных условиях (при температуре +4° С), начинались со 2-ой недели, к концу 6-ой недели почти все головки были разрушенными. Следовательно, при обнаружении трупа через 1,5-2 месяца после события нет оснований отказываться от установления наличия в полостях спермы и дальнейшего ее исследования. [5]

Сперматозоиды могут быть разрушены в следах спермы не только под действием микрофлоры влагалища, но и в результате воздействия на пятно различных внешних факторов. Кроме того, при некоторых патологических состояниях (олиго- и азооспермия) сперматозоиды или полностью отсутствуют в следах спермы, или содержатся в очень малом количестве, затрудняющем их морфологическое исследование.

3. В случаях, когда судебный биолог не выявляет морфологически различимых элементов спермы в подозрительных пятнах, либо найдены только единичные головки сперматозоидов, применяются иммунологические методы.

В настоящее время находит широкое применение мембранный диагностический тест для судебной-медицинского анализа, позволяющий обнаружить присутствие спермы (семенной жидкости) путем полуколичественного определения PSA (простатического специфического антигена).

PSA (простатический специфический антиген) - гликопротеин, продуцируемый в простате и секретиремый в семенную жидкость. Концентрация PSA в семенной жидкости составляет 0,2 - 3 мг\мл. Главная функция PSA - обеспечение жидкого состояния спермы. PSA содержится не только в сперме, так, например, содержание PSA в вагинальном содержимом составляет 0,4 - 0,9 нг\мл. Такие жидкости, как кровь, моча тоже содержат PSA. В сыворотке крови мужчины концентрация PSA составляет 4 нг\мл и возрастает она только в случаях заболеваний предстательной железы до 200 нг\мл. Количество PSA в моче здорового мужчины в некоторых случаях достигает 800 нг\мл. В случае неясности в дифференциации между семенной жидкостью и мочой возможно определение концентрации PSA в разведенных пробах. [6]

Принцип теста: хроматографическое иммунологическое исследование, выполняемое на тест-пластинке. Тест содержит два вида моноклональных мышиных анти- PSA антител (одни иммобилизованы в зоне теста «Т», другие - подвижные и меченные атомами золота, располагаются у окошка для внесения пробы) и поликлональные анти-мышинные антитела (в зоне внутреннего стандарта и в зоне С (контроля)). [6]

Тест способен определять PSA в концентрации от 2 нг\мл до 100 мкг\мл. При концентрации PSA, равной 500 мг\мл можно наблюдать феномен «прозоны». Линия

внутреннего стандарта (центральная) соответствует концентрации PSA, равной 4 нг\мл. [6]

PSA положительные пробы проявляются 3 линиями: линия 1 - результат (только PSA положительные пробы), линия 2 - внутренний стандарт (коррелирует с концентрацией приблизительно 4 нг/мл PSA), линия 3 - контроль. PSA отрицательные (ниже определяемого предела) пробы проявляются 2 линиями в результате: линия 1 - не определяется. Появление линии 2 (внутренний стандарт) и линии 3 (контроль) подтверждают действительность теста. [6]

Преимущества определения PSA:

- возможность установить наличие спермы, когда сперматозоиды отсутствуют (мужчины с азооспермией, вазэктомией);

- возможно установление наличия PSA даже в малом количестве спермы;

- PSA характеризуется хорошей устойчивостью. В вагинальном секрете происходит постоянное разложение PSA. Определить PSA в вагинальном секрете можно в среднем спустя 14-47 часов после полового акта. Зафиксированы случаи, когда PSA был определен в пятнах с семенной жидкостью 30-летней давности.

- PSA - признак, более специфичный чем определение кислой фосфатазы.

- тесты просты, удобны в обращении.

На территории Республики Беларусь, ввиду высокой стоимости тестов, данная методика применяется в последнюю очередь, когда классические морфологические методы исчерпали свои возможности, либо когда малое количество исследуемого материала не позволяет эксперту использовать менее эффективные методики. Стоимость одного определения сегодня составляет более 7000 белорусских рублей. В то время как по одному расследуемому случаю приходится исследовать до 100 и более объектов.

Проблема исследования смешанных пятен.

Выявление группоспецифических антигенов системы АВО в смешанных пятнах представляет собой сложную проблему, так как в основном исследуются выделения из открытых полостей тела человека: ротовой, вагинальной, анальной. В таком материале всегда содержится большое количество микрофлоры, обладающей серологической активностью, способной исказить истинный фенотип индивидуума, обуславливая в ряде случаев кажущееся несовпадение антигенных характеристик крови и выделений одного и того же человека. Кроме того, в разных участках одного и того же пятна может находиться различное количество клеточного материала.

При половых преступлениях или при подозрении на них, для решения вопроса от групповой принадлежности спермы в представленных на экспертизу следах на вещественных доказательствах, которые, как правило, имеют примесь эпителиальных клеток или крови, возникает необходимость их разделения. С этой целью было предложено применение техники дифференцированного лизиса, ранее используемого при ДНК-анализе для выделения генетического материала сперматозоидов из «смешанных» следов.

Этот метод основан на разнице в химическом строении клеточных оболочек сперматозоидов и эпителиальных клеток, а именно - наличие в мембране сперматозоидов большого количества дисульфидных связей, что способствует повышенной устойчивости сперматозоидов к воздействию факторов внешней среды. Во время предварительной инкубации в растворе, содержащем лизирующие агенты и протеолитический фермент, происходит разрушение клеточных оболочек и ядер

буккального и влагалищного эпителия, клеток крови. Без разрушения дисульфидных связей специальными химическими агентами (дитиотреитолом) эти связи не позволяют эффективно расщеплять белки сперматозоидов протеолитическими ферментами (в частности, протеиназой К или другими). Сперматозоиды преимущественно сохраняются. [11]

После вышеописанной обработки пятен проводится определение группоспецифических антигенов системы АВО спермы, сохранившейся в пятне, общепринятой методикой реакции абсорбции-элюции.

Этот метод не требует более тонких расчетов реактивов и выдержки временных параметров, выходящих за пределы обычных при проведении классических серологических реакций.

Таким образом, нами освещены диагностические возможности судебной биологии в исследовании следов спермы при расследовании половых преступлений на современном этапе развития судебно-биологической науки.

Идентификационные вопросы наиболее достоверно и эффективно разрешаются с помощью генотипоскопического исследования следов спермы, которому будет посвящена наша следующая публикация.

Литература

1. Барсегянц, Л. О., Левченков, Б. Д. Судебно-медицинская экспертиза выделений организма. М.: Медицина, 1978. 143 с.
2. Дергай, Г. Б. «Современные возможности судебных экспертиз»: учеб. пособие. Акад. МВД Республики Беларусь, 2000.
3. Дерягин, Г. Б. // Суд.-мед.эксперт. 2006. № 5.
4. Дмитриева, О. А. // Суд.-мед.эксперт. 2004. № 3.
5. Дмитриева, О. А. // Суд.-мед.эксперт. 2008. № 1.
6. «Полное руководство по применению мембранных иммунологических тестов на выявление простатического специфического антигена (PSA).»
7. Барсегянц, Л. О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. М.: Медицина, 1999. 135 с.
8. Свирский, М. С., Зайцев, В. В. Определение компонентов и изолированная диагностика групповых антигенов спермы и влагалищных выделений в смешанных пятнах // Суд.-мед.эксперт. 1980. № 2.
9. Туманов, А. К. Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. «Медицина», М., 1975.
10. Методические рекомендации по основным методам исследования вещественных доказательств. ЦСБЛ. Минск, 2001.
11. Материалы международной конференции «Актуальные вопросы сотрудничества судебно-медицинских служб государств-участников Содружества Независимых Государств». Минск: «Медисонт», 2007. Раздел 6. С. 227-237.