**МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**РГКП «ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ» МЮ РК**

**МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

**Нур-Султан 2020г.**

**ПАСПОРТ МЕТОДИКИ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Наименование методики | Методика установления групповой принадлежности биологических объектов на вещественных доказательствах |
| 2. | Шифр специальности методики | 25.1 Судебно-биологическое исследование (медицинское) |
| 3. | Информация об авторе (составителе) | Составитель: **Итбаева Ж.Ж.-** судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан; |
| 4. | Сущность методики | Для групповой системы АВО постоянным признаком является наличие изоантигенов в эритроцитах и нормальных групповых антител в плазме крови. Метод основан на реакции гемагглютинации. Агглютинация эритроцитов опосредована антителами. |
| 4.1. | Экспертные задачи, решаемые методикой | Установление групповой принадлежности |
| 4.2. | Объекты исследования | Биологические объекты |
| 4.3. | Методы исследования | серологический |
| 4.4. | Краткое поэтапное описание методики | Принцип комплекса антиген-антитело. Учет реакции макро- и микроскопический. |
| 5. | Номер, дата протокола Ученого совета Центра | Протокол №1 от 18.06.2020 года |
| 6. | Информация о лице, составившем паспорт методики | **Итбаева Ж.Ж.-** судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан; |

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

**МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

**Установление групповой принадлежности в образцах жидкой крови по Шиффу**

Введение………………………………………………………………………5

Техника постановки реакции…………………………………………………6

Техника проведения встречного иммуноэлектрофореза……………………6

**Установление групповой принадлежности жидкой крови с применением моноклональных антител анти-А, анти-В и анти-Н**

Введение………………………………………………………………………6

Выявление антигенов А и В***.*** …………………………………………………7

Выявление антигена Н……………………………………………………….7

Особенности работы с моноклональными антителами…………………….8

**Определение изогемагглютининов**

Определение изогемагглютининов по методу Ляттеса…………………….8

Определение изогемагглютининов по методу Кисина*.*…………………….8

Определение изогемагглютининов по методу Марцинковского*……..……*9

Определение изогемагглютининов по методу Серопяна…………….……9

Определение изогемагглютининов методом приготовления искусственной корочки……………………………………………………………………………..9

Определение изогемагглютининов методом экстрагирования…………….9

**Применение «нагрузки» агглютининами**

Введение……………………………………………………………………….9

Особенности реакции*.*………………………………………………………..10

Виды нагрузки*……………………………………………………………………….*10

**Установление антигенов системы АВО аффинной хроматографией.**

Первый этап -очистительная хроматография…..………………………….11

Второй этап*.*…………………………………………………………………..11

**Установления групповой принадлежности выявление антигенов А, В, Н в клетках плоского эпителия реакцией смешанной агглютинации**

Техника проведения реакции………………….…..…………………………12

Учет результатов*.*………………………….…………………………………12

**Установление групповой принадлежности выявлением антигенов А, В, Н реакцией абсорбции - элюции**

Техника постановки реакции..……………………………………………….12

Обнаружение антигенов А и В моноклональными сыворотками*.*………...13

Обнаружение антигена Н моноклональными сыворотками………………14

**Установление групповой принадлежности выявлением антигенов А, В, Н в крови реакцией смешанной агглютинации**

Введение……………………………………………………………………..15

Техника постановки реакции..…………………………..…………………..15

**Выявление антигена Р в жидкой крови и пятнах методом РАЭ и КРА**

Метод выявления антигена Р в пятнах крови реакцией абсорбции – элюции по М. С. Свирскому……………………………………………………………….15 Метод выявления антигена Р реакцией абсорбции – элюции по М. Ф. Верещаку..…………………………..……………………………………………..16

Метод определение антигена Р в жидкой крови.........................................17

Метод выявление антигена Р в пятнах реакцией абсорбции агглютининов (КРА)..................................................................................................17

**Определение антигенов системы MNSs в жидкой крови и пятнах**

Метод определения антигенов системы MNSs в жидкой крови…………..18

Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах кровиреакцией абсорбции—элюции.………………………...……………………………………..19

Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах кровиреакцией абсорбции—элюциис помощью элюата.................................................................19

Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах кровиреакцией смешанной агглютинации.........................................................................................20

**Определене системы гаптоглобина (Нр) в жидкой и в пятнах крови**

Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в жидкой крови……….20

Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в пятнах крови ………..21

Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в крахмально-агаровом геле**………………………………………………………………………………….**23

**Метод установления групповой принадлежности выявлением антигенов А и В количественной реакцией абсорбции изогемагглютининов**

Введение………………………………………………….…………..………24

Постановка реакции …..………………………...……………………............24

**Метод выявления антигенов А, В, Н в гнилостно – измененных мышцах реакцией абсорбции – элюции**

Подготовка материала……..……………………………………………......24

Абсорбция ………..………………………...……………………………..…...24

Элюция.………………………………………………………………………24

Учет результатов……………………………………………………………24

**Выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах**

Метод выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах реакцией смешанной агглютинации (по методу Колыш) ……………………...24

Методика выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах реакцией абсорбции - элюции (по методу Свирского, Богуславского)…….......24

**Метод подготовки фрагментов костей, ногтей и зубов для выявления антигенов системы АВ 0**

Введение материала в реакцию……………………………………………..25

Техника подготовки материала……………………………………………..26

**Метод выявления групповых антигеновА, В, Н в костной ткани**

Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костной ткани методом реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации…………27

Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях реакцией абсорбции – элюции (по Гуртовой)……………………..*..*………………………27

Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях на бляшках реакцией абсорбции – элюции………………………………………………….27

Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях реакцией абсорбции - элюции (по Стегновой)……………………………………............28

**Методика исследования гнилостно измененных следов крови и выделений человека**

Введение………………………………………………….…………..……….28

Подготовка материала…..……………………………………………...........29

Способы предварительной обработки материала при исследовании бактериально загрязненных пятен……………………………………………….30

Перечень использованных источников..………………………….…………...31

**МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

**Установление групповой принадлежности в образцах жидкой крови по методу Шиффа**

**Введение**

Для определения групповой принадлежности жидкой крови изосыворотками анти-А и анти-В применяют пробирочный ме­тод.

Берут 4 агглютинационные пробирки, на 1-й из них делают надпись «анти-В + А»; на 2-й — «анти-В + В»; на 3-й «анти-А + А; на 4-й — «анти-А + В». В 1-ю и 2-ю пробирки пастеровской пипеткой закапывают по 2 капли проверяемой сыворотки анти-В, в 3-ю и 4-ю — такое же количество сыворотки анти-А; в 1-ю и 3-ю пробирки добавляют по 4 капли свежеприготовленной 1 % взвеси стандартных эритроцитовгруппы А, во 2-ю и 4-ю по 4 капли такой же взвеси стандартных эритроцитов группы В.

Ингредиенты смешивают, встряхивая пробирки в штативе, центрифугируют в течение 4 мин, расставляют пробирки в штативе в первоначальном порядке и снова встряхивают до получения равномерной взвеси эритроцитов там, где агглютинация отсутствует.

Агглютинацию оценивают невооруженным глазом. Содержимое тех пробирок, в которых агглютинация не видна, выливают на соответственно обозначенные предметные стекла, накрывают покровными стеклами и подвергают микроскопическому исследованию.

В пробирках, где имеются одноименные сыворотки и эритроциты (анти-А + А, анти-В + В), должны быть видны невооруженным глазом конгломераты эритроцитов, а в пробирках с разноименными.

Сыворотками и эритроцитами (анти-В + А, анти-А + В) не должно быть агглютинации эритроцитов даже при микроскопическом исследовании.

После проверки действия изосывороток анти-А и анти-В приступают к работе с исследуемыми образцами. Каждый образец помечают порядковым номером. Жидкую кровь центрифугируют, отделяют сыворотку и помещают в другую пробирку. Из осадка эритроцитов готовят 1 % взвесь эритроцитов (взвесь должна быть окрашена в розовый цвет). В штатив устанавливают 4 агглютинационные пробирки. На 1-й пробирке делают надпись — «э + анти-В», на 2-й «э + анти-А», на 3-й «с + А», на 4-й — «с + В». В 1-ю и 2-ю пробирки прилива­ют по 4 капли 1 % взвеси исследуемых эритроцитов, в 3-ю и 4-ю — по 2 капли исследуемой сыворотки. В две пробирки со взвесью эритроцитов добавляют стандартные сыворотки: в 1-ю пробирку — 2 капли сыворотки анти-В, во 2-ю — такой же объем сыворотки анти-А. В две пробирки с сывороткой вводят стандартные эритроциты: в 3-ю пробирку — 4 капли 1 % взвеси эритроцитов группы А, в 4-ю такое же количе­ство взвеси эритроцитов группы В. Пробирки встряхивают в штативе, центрифугируют в течение 4 мин, расставляют в штативе и вновь встряхивают до получения равномерной взвеси эритроцитов там, где агглютинация отсутствует. Если крови мало, то количество капель крови можно уменьшить (1 капля сыворотки + 2 капли взвеси эритроцитов).

При определении группы крови плодов или детей в возрасте до 1,5—2 лет время центрифугирования увеличивают до 15—30 мин.

**Проверка действия гетероиммунных сывороток анти-А и анти-В.**

На предметное стекло или фарфоровую тарелку пастеровской пипеткой наносят по 2—3 капли испытуемой сыворотки анти-В в два квадрата (тарелку предварительно делят на 4 квадрата карандашом по стеклу), а в два других квадрата -столько же капель сыворотки анти-А. К одной порции сывороток анти-В добавляют стандартные эритроциты группы В (для установления агглютинирующей способности), к другой — стандартные эритроциты группы А (для проверки специфичности). К одной порции сыворотки анти-А прибавляют стандартные эритроциты группы А, к другой — группы В. Объем стан­дартных эритроцитов должен быть в 20 раз меньше объема сыворотки. Сначала эритроциты наносят рядом с каплей сыворотки, а затем смешивают с ней отдельными стеклянными палочками или дном чистых агглютинационных пробирок. Смесь должна распределяться по поверхности тонким слоем. Стекла (или тарелку) слегка покачивают. Результаты реакции наблюдают невооруженным глазом или с помощью лупы при ярком электрическом освещении. Появление агглютинации од­ноименных стандартных эритроцитов к 5—10-й секунде указывает на достаточную агглютинационную способность сыворотки, а отрицательный результат реакции с разноименными эритроцитами к 5-й минуте и более — на удовлетворительную специфичность.

**Определение антигена Н.**

Антиген Н определяют так же, как и антигены А и В при работе с иммунными сыворотками. Применяют трижды отмытые эритроциты группы 0. Каплю сыворотки анти-Н помещают на плоскости (фарфоровая тарелка, предметное стекло), к ней добавляют 1 каплю отмытой крови из расчета 10:1, ингредиенты смешивают. Экспозиция равна 5 мин при постоянном покачивании тарелки или предметного стекла. Для установления специфичности сыворотки анти-Н ис­пользуют стандартные эритроциты группы А, В без вещества Н.

**Установление групповой принадлежности жидкой крови с применением моноклональных антител анти-А, анти-В и анти-Н**

**Введение**

Группоспецифические моноклональные антитела продуцируются гибридомами. получаемыми в результате слияния лимфоцитов иммунизированных соответствующимантип животных с клетками мисломиых штаммов, Слившиеся гибридомные клетки приобретают от лимфоцита способность синтезировать определенное антитело, а от миеломного партнера возможность неограниченного размножения. После выделения интересующего клона осуществляют его накопление invitro или invivo, вырабатываемые антитела абсолютно идентичны между собой по структуре, специфичности и другим параметрам.

Моноклональные реагенты анти-А , анти-В и анти-Н представляют собой разведенную раствором хлорида натрия асцитную жидкость мышей, являющихся носителем соответствующей гибридомы.

1. ***Выявление антигенов А и В.*** Осуществляют пробирочным способом: к двум каплям реагента анти-А или анти-В добавляют 1 каплю 3% взвеси однократно отмытых эритроцитов в физиологическом растворе/ кровь с признаками гемолиза отмывают до получения бесцветной надосадочной жидкости/ содержимое пробирок смешивают встряхиванием и центрифугируют 2 минуты при 1500 об'/мин. Результат учитывают макро- и микроскопически после легкого встряхивания пробирок. Иногда, главным образом при исследовании длительно хранившейся трупной крови, может наблюдаться слабовыраженное неспецифическое склеивание эритроцитов-аутоагглютинация. В этих случаях следует провести пробу, заключающуюся в центрефугировании в указанном режиме 3% взвесей эритроцитов без добавления реагентов. При наличии агглютинации групповая принадлежность крови устанавливается общепринятыми методами после высушивания образца.

**2*.Выявление антигена Н.***

Техника реакции не отличается от описанной выше для реагентов анти-А и анти-В. Следует однако отметить, что моноклональные тела анти-Н, обладая высокой активностью, реагируют с образцами крови всех групп, поскольку антиген Н присутствует в эритроцитах всех индивидуумов.за исключением крайне редких Н-дефицитных фенотипов. Это диктует необходимость выбора рабочего разведения, которое устанавливается путем титрования реагента эритроцитами группы АВ, содержащими возможно более слабо выраженный антиген Н. В реакции используют то минимальное разведение реагента, при котором агглютинация с указанными эритроцитами отсутствует. С эритроцитами группы 0 при этом должна наблюдаться агглютинация, видимая только невооруженным глазом. При выборе рабочего разведения должны использоваться эритроциты, взятые в день исследования. Принцип выбора рабочего разведения реагента анти-Н показан в таблице.

|  |
| --- |
| Групповая при- Разведения реагента анти-Н  надлежность тест  эритроцитов Н 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 |
| 0 (+) (+) (+) (+) (+) (+) ++++ +++ ++ + -  АВ +++ +++ ++ + + - - - - - - |

Н-выпускаемый реагент

(+)-агглютинация, видимая невооруженным глазом

++++,+++,++,+- агглютинация под микроскопом (разная степень выраженности)

--отрицательный результат(агглютинаты по 2-4 эритроцита не учитывать)

В приведенном случае рабочее разведение реагента анти-Н составляет 1:32

Разведение готовят extempore.

**Особенности работы с моноклональными антителами :**

А)Моноклональные антитела более, чем агглютинины стандартных изо- и гетероиммунных сывороток, чувствительны к загрязнению лабораторной посуды. В случае недостаточного ее обезжиривания моноклональные антитела вызывают прилипание эритроцитов к стенкам пробирокк, что возможным учет результатов реакции. После тщательного промывания лабораторной посуды водопроводной и дистиллированной водой рекомендуется производить ее обработку смесью равных объемов этилового спирта и эфира и стерилизовать в сухожаровом шкафу.

Б) Выраженность агглютинации, полученной при применении моноклональных антител, довольно существенно уменьшается после встряхивания пробирок. Это, в особенности, касается случаев слабо выраженной агглютинации. В связи с этим учет результатов реакции следует производить сразу же после встряхивания, которое должно быть легким и одновременно встряхивать не более двух пробирок.

**Определение изогемагглютининов**

**Определение изогемагглютининов по методу Ляттеса**

Из пятна крови вырезают три кусочка размером около 2x2 мм, два из них помещают на противоположные концы одного предметного стекла, третий — на другое предметное стекло. К ним добавляют 0,1 % взвесь стандартных эритроцитов: к первому кусочку — группы А, ко второму — группы В, к третьему — группы 0. Препараты накрывают покровными стеклами. Взвесь эритроцитов должна занимать все пространство между предметным и покровным стеклами. Избыток взвеси удаляют фильтровальной бумагой. Препараты помещают во влажные камеры. Периодически проводят микроскопическое исследование.

**Определение изогемагглютининов по методу Кисина**

К одной капле вытяжки из пятна крови в отдельных пробирках добавляют по 2 капли 0,5% взвесь стандартных эритроцитов групп А, В и 0. Затем пробирки помещают в термостат на 2,5 часа при температуре 370С.

Учет проводится микроскопически после охлаждения и центрифугирования 3-4 минуты при 1500 об/мин.

**Определение изогемагглютининов по методу Марцинковского**

Из пятен крови делают навески, которые помещают в пробирки и заливают дистиллированной водой. После экстрагирования в течение 18—20 ч в условиях рефрижератора (4 °С) вырезают из хроматографической бумаги небольшие полоски и вставляют в пробирки таким образом, чтобы бумага одним концом соприкасалась с жидкостью, а другой конец выступал из пробирки. Спустя 4—6 ч на свободном краю бумаги скапливается вытяжка. Бумагу вынимают, высушивают, конец, пропитанный вытяжкой, делят на 3 части и помещают на два противоположных конца одного предметного стекла и на второе предметное стекло. Дальнейшее исследование проводят так же, как в предыдущем случае.

**Определение изогемагглютининов по методу Серопяна**

Ниточки из пятна крови длиной 0,5 см в отдельных пробирках заливают 0,1% взвесью стандартных эритроцитов группы А, В и 0 и оставляют на 1 час при комнатной температуре периодически встряхивая. Затем пробирки последовательно помещают на 10 минут в термостат при 500С и на 10 минут в морозильную камеру. Результаты учитывают микроскопически после 3-х минутного центрифугирования при 3000 об/мин.

**Определение изогемагглютининов я методом приготовления искусственной корочки**

Вырезки из объектов, предметов – носителей экстрагируют дистиллированной водой в течение 18 часов при комнатной температуре. Вытяжки многократно наслаивают на предметные стёкла (по 3 препарата из каждого объекта), высушивают и к ним добавляли 0,2 % взвесь стандартных эритроцитов групп А, В, О, соответственно маркировке. Учет результатов микроскопический в течение рабочего времени.

**Определение изогемагглютининов методом экстрагирования**

Марлю, пропитанную кровью, измельчают, помещают в пробирку и заливают дистиллированной водой (вода должна пропитать материал и остаться в очень небольшом избытке). Объекты помещают в холодильник при 4 "С примерно на сутки. Вытяжку отсасывают пастеровской пипеткой и центрифугируют. Две капли ее наносят на два противоположных конца предметного стекла, а третью — на другое предметное стекло, высушивают при комнатной температуре. К одной из образовавшихся корочек добавляют 0,1 *%* взвесь стандартных эритроцитов группы А, к другой — группы В и к третьей — группы 0. Препараты накрывают покровным стеклом, устанавливают во влажные камеры и периодически в течение рабочего дня контролируют микроскопически.

**Применения «нагрузки» агглютининами**

**Введение**

При определении групп крови и выделений (слюны, спермы и пр.) в следах на вещественных доказательствах выявлению агглютиногенов изосерологической системы АВО (агглютигенов) нередко препятствует неблагоприятное воздействие на стандартные гемагглютинирующие сыворотки со стороны загрязненных материалов вещественных доказательств. Особенно проявляется такое воздействие на изосыворотки b и а.

Для устранения указанного препятствия в установлении групповой принадлежности объектов исследования рекомендуется прибегать к методу «нагрузки» агглютинами.

Данный метод основан на том, что при контакте пятна крови с сыворотками на последние действует как кровь «слюна, сперма и пр.), так и материал вещественного доказательства, на котором пятно расположено; в контрольном опыте на сыворотки влияет только предмет-носитель (со всеми имеющимися на нем загрязнениями). Поэтому повторные добавления сывороток дают возможность уловить разницу между действием двух факторов в первом случае и одного фактора - во втором.

**Особенности реакции**

При использовании метода «нагрузки» агглютинами необходимо иметь в виду следующее:

1. в процессе повторных реакций абсорбции агглютининов с одним и тем же объектом исследования постепенно понижается абсорбционная способность содержащихся в нем агглютиногенов;
2. в случае присутствия в пятнах слабо выраженных агглютиногенов «нагрузка» агглютинами нередко оказывается малоэффективной.

Присущие каждому образцу крови и выделений индивидуальные особенности не позволяют привести определенные цифровые данные в отношении высоты титра и объема сывороток, применяемых при методе «нагрузки» агглютинами, но некоторые общие указания все же могут быть сделаны.

**Виды нагрузки**

1.Если показатели снижения титра стандартных сывороток после воздействия их с пятном крови (выделений) и предметом – носителем являются высокими(например,6 ступеней поглощения, при вторичной абсорбции следует добавить новую порцию сывороток в том же титре и объеме, что и для первой абсорбции. При наличии в крови (выделении) обвиняемого и потерпевшего, сильно выраженных агглютиногенов для повторной абсорбции можно использовать сыворотки даже с более высоким титром или добавить их к исследуемому материалу (пятну и предмета - носителю) в большом объеме. Чем первоначально (допустимо одновременно повышать титр сывороток и увеличить их объем). Особенно это относится к определению групп, в следах выделений человеческого организма, где агглютиногены обычно (за исключением случаев слабого «выделительства» групповых веществ) весьма сильно выражены.

2.При отчетливой, но недостаточной для выводов разнице в степени ослабления титра сывороток после контакта с пятном и контрольном участком материала вещественного доказательства (например, 6 ступеней поглощения- пятно, 4 ступени- предмет- носитель) сыворотки для вторичной абсорбции должны быть употреблены либо в титре и объеме, равных первоначальным, либо в более низком титре или в меньшем объеме( иногда можно понизить титр сывороток и уменьшить их объем) .

3.В случае, когда результаты выявления агглютиногенов в образцах крови или выделений обвиняемого и потерпевшего, либо данные первой реакций абсорбции указывают на наличие в пятне слабо выраженных агглютиногенов, при «нагрузке» агглютинами следует пользоваться сыворотками с более низким титром, чем первоначально(например, с титром 1:16 вместо 1:32), и добавить их в меньшем объеме.

4.Если нагрузка агглютинами не устранила в достаточной мере неблагоприятное воздействие предмета-носителя на сыворотки (сыворотку), прибегают к повторной нагрузке, а при неудовлетворительном ее исходе- к нагрузке в третий раз и т.д. многократную нагрузку осуществляют с учетом небходимых изменений в титре и объеме стандартных сывороток(см. пп. 1.2,3).

5.Метод нагрузки агглютинами применим при реакции абсорбции, проводимой не только и изосыворотками b и а, но и с иммунными гемагглютинирующими сыворотками анти-В, анти-А и анти-Н.

6. Для нагрузки агглютинами употребляют сыворотки тех же серий, что и при первой реакции, причем обе сыворотки каждой пары (b и а или анти-В и анти-А) вводят в опыт с одинаковыми титром, и в равном объеме, вне зависимости от того, какая сыворотка подвергалась неблагоприятному воздействию со стороны материала вещественного доказательства.

**Определение антигенов системы АВО аффинной хроматографией**.

Определение групповой принадлежности методом аффинной хроматографии проводят в два этапа.

**Первый этап -очистительная хроматография.**

Лист хроматографической бумаги делят карандашом на 6 частей. Ширина каждой части составляет 1 см. Длина хроматографического листа 40 см. Из пятна крови и контрольного участка предмета-носителя берут по 3 нити. Каждую нить прикрепляют к одному из участков хроматографической бумаги. Хроматографическую бумагу опускают в стеклянную камеру высотой 40 см, на дно которой введены следующие инфедиенты: чистый бутанол либо бутанол (7 частей) и аммиак (3 части). Нити, прикрепленные к хроматографической бумаге, не должны соприкасаться с жидкостью. Хроматография длится 40 мин при комнатной температуре. Спустя указанное время хроматограмму вынимают из стеклянной камеры, высушивают при комнатной температуре.

**Второй этап:**хроматограмму делят на 6 частей; полоску бумаги с прикрепленной на ней нитью из пятна крови и полоску хроматографической бумаги с имеющейся на ней нитью, взятой из предмета-носителя, помещают в бюкс с изоиммунной сывороткой анти-А. Так же поступают со второй полоской хроматографической бумаги с нитями из пятна крови и предмета-носителя, ее помещают в бюкс с сывороткой анти-В. Третью полоску хроматографической бумаги с нитью из пятна крови и предмета-носителя помещают в третий бюкс с сывороткой анти-Н. Сыворотки предварительно разводят изотоническим раствором хлорида натрия из расчета: при титре сывороток 1:64 их разводят в 18—20 раз. Нити не должны соприкасаться с сыворотками, между верхней поверх­ностью жидкости и нитями должно быть расстояние не менее 1 см. Экспозиция составляет 18 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени нити с хроматографической бумаги удаляют, помещают на предметные стекла и приливают по 2 капли изотонического раствора хлорида натрия. Элюцию проводят в течение 30 мин при 52 °Сс последующей 1,5-часовой экспозицией препаратов при комнатной температуре во влажных камерах. Спустя указанное время к объектам иссле­дования приливают по 1 капле 0,1 % взвеси эритроцитов групп А, В и 0 и после 15-минутного интервала накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Элюцию можно проводить и во взвесь эритроцитов. Кроме того, элюцию можно проводить и в пробирках. С этой целью нити помещают в пробирку, добавляют по 2 капли изотонического раствора хлорида натрия, ингредиенты экспонируют в течение 30 мин при температуре 52 °С. Затем в элюаты добавляют взвесь эритроцитов (1 *%)* групп А, В и 0, объекты центрифугируют в течение 4 мин и учитывают результаты исследования.

**Установление групповой принадлежности выявление антигенов А, В, Н в клетках плоского эпителия реакцией смешанной агглютинации**

**Техника проведения реакции**

Фиксированные препараты после установления наличия клеток, заведомые образцы клеток буккального эпителия групп … абсорбировали изогемагглютинирующими (гетероиммунными, цоликлонами) сыворотками анти-А серии ..., анти-В серии ... с титром ..., экстрактом бузины (цоликлоном анти-Н) серии ... с титром .... Абсорбция в течение 20 часов при Т+4°C. Отмывание охлажденным физиологическим раствором. На препараты наносили 0,25 % взвесь стандартных эритроцитов групп А, В, О.

**Учет результатов**

Учет микроскопический после 2-х часового выдерживания препаратов на предметных стеклах во влажных камерах при комнатной температуре. Результаты реакции отражены в прилагаемой таблице

**Установление групповой принадлежности выявлением антигенов А, В, Н реакцией абсорбции – элюции**

**Техника постановки реакции**

После предварительной обработки нитей, взятых из пятен крови, и предмета-носителя (см. описание постановки реакции смешанной агглютинации) и помещенных на предметные стекла, каждый объект заливают 1—2 каплями **изо- или иммунных сывороток** анти-А, анти-В, анти-Н (при проведении реакции абсорбции-элюции целесооб­разно применять сыворотки, содержащие иммуноглобулины класса G). Препараты помещают во влажные камеры и экспонируют в течение 20 ч при 4 °С. Затем 6 раз промывают охлажденным (2 °С) изотоническим раствором хлорида натрия. Для проведения элюции можно использовать как изотоничес­кий раствор хлорида натрия, так и взвесь эритроцитов. При элюции к каждому объекту исследования приливают по 1—2 капле изотонического раствора хлорида натрия. Объекты во влажных камерах устанавливают в термостат при температуре от 46 до 54 °С на 30 мин, затем в течение 1,5 ч их выдерживают при комнатной температуре.

Для приготовления взвеси цельные эритроциты предварительно трижды отмывают. Концентрация взвеси не должна превышать 0,2 %. Эритроциты добавляют к объектам исследования либо через 1,5 ч пребывания объектов при комнатной температуре, либо через 30 мин после тепловой их обработки. Перед учетом результатов во все объекты добавляют по 1 капле изотонического раствора. При элюции взвесь эритроцитов 3 раза отмывают, из них готовят 0,2 *%* взвесь, которую наносят на каждый объект. Параметры проведения реакции абсорбции-элюции те же. Последним этапом реакции и в этом случае является добавление ко всем объектам исследования капли изотонического раствора хлорида натрия.

Одномоментное определение антигенов А и В реакцией абсорбции — элюции. После предварительной обработки пятен крови (см. предыдущий раздел) нить длиной 0,5 см из пятна крови и предмета-носителя помещают на предметное стекло и заливают 2 каплями смеси изосывороток анти-А и анти-В (предварительно изосыворотки смешивают в равных объемах и экспонируют в течение 1 ч при комнатной температуре). Препараты помещают во влажные камеры и выдерживают в течение 18 ч при 4 "С, затем 6 раз промывают охлажденным (2°С) изотоническим раствором хлорида натрия. Для проведения стадии элюции препараты заливают изотоническим раствором хлорида натрия, после чего экспонируют во влажных камерах в термостате при 52 °С 30 мин, а затем 1,5 ч выдерживают при комнатной температуре. Спустя указанный срок часть жидкости переносят на другое предметное стекло. К жидкости, находящейся на первом предметном стекле, приливают 1 каплю 0,2 % взвеси эритроцитов группы А, а к жидкости на втором предметном стекле — взвесь эритроцитов группы В. Экспозиция составляет 20 мин при комнатной температуре во влажных камерах. Спустя указанный срок препараты накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

**Обнаружение антигенов А и В моноклональными сыворотками.** При применении моноклональных антител анти-А и анти-В предварительную обработку пятен рекомендуется производить с помощью 0,1 *%* раствора трипсина. Кусочки материала или нити со следами крови либо выделений, а также контрольные участки предмета-носителя помещают на предметное стекло и к ним добавляют 0,1 % раствор трипсина. Объекты помещают во влажные камеры и устанавливают в термостат при 37 °С в течение 30 мин. Далее раствор трипсина отсасывают, объекты дважды промывают изотоническим раствором хлорида натрия и высушивают на фильтровальной бумаге. На предметные стекла помещают по две нити длиной по 0,5 см каждая и добавляют к ним по 2 капли реагента. Обычно в этой реакции моноклональные антитела используют в титре 1:16—1:128. Абсорбцию проводят при 4 °С. Отмывание производят в пластинах охлажденным изотоническим раствором, 3 раза. Общая продолжительность отмывания каждого объекта составляет 10—15 мин.

Для элюирования абсорбированных антител исследуемые нити помещают на предметные стекла и добавляют к ним 1 каплю 0,1 % взвеси соответствующих эритроцитов в изотоническом растворе. Объекты устанавливают во влажные камеры. Экспозиция происходит в термостате при 50 °С в течение 30 мин, а затем в течение 1—2 ч при комнатной температуре. Спустя указанный срок к каждому объекту приливают по 1 капле изотонического раствора, препараты накрывают покровным стеклом и микроскопируют. При учете результатов необходимо надавить на покровное стекло.

**Обнаружение антигена Н моноклональными сыворотками.** Материал предварительной обработке не подлежит. На предметные стекла помещают по 4 нити (длиной по 0,5 см) из пятна крови или выделений, а также предмета-носителя, добавляют к ним по 3 капли реагента анти-Н в титре 1:8—1:64. Абсорбцию проводят во влажных камерах при 4 °С. Экспозиция продолжается 20 ч. Препараты промывают описанным выше способом. Элюирование проводят в 0,1 % взвесь эритроцитов в изотоническом растворе 30 мин при 50 °С. Каждый объект разделяют на две части, к одной добавляют эритроциты группы 0, к другой — эритроциты группы А,В. После тепловой обработки препараты оставляют на 2 ч при комнатной температуре. Агглютинация стандартных эритроцитов группы 0 при отсутствии таковой с эритроцитами группы А,В, свидетельствует о выявлении в этом объекте антигена Н.

По данным ряда авторов, работа с моноклональными антителами осуществляется таким же образом, как и с изо- и иммунными сыворотками анти-А, анти-В и анти-Н.

**Установление групповой принадлежности выявлением антигенов А, В, Н в крови реакцией смешанной агглютинации**

**Введение**

Из пятна крови и предмета-носителя берут по 3 нити длиной 0,5 см каждая и помещают на предметные стекла. К каждой нити приливают по 1 капле метанола для фиксации, которая продолжается 15 мин. Затем приступают к проведению самой реакции смешанной агглютинации, которую выполняют в двух вариантах.

**Техника постановки**

*Вариант I.* Исследуемые нити помещают на отдельные предметные стекла. К первой нити добавляют 1—2 капли изосыворотки анти-А, ко второй — 1—2 капли изосыворотки анти-В, к третьей — 1—2 капли иммунной сыворотки анти-Н. Точнотак же поступают с гетероиммунными сыворотками анти-А и анти-В. Для абсорбции препарат экспонируют в течение 20 ч в холодильнике при 4 °С. После этого объекты 5 раз промывают охлажденным (2 "С) изотоническим раствором хлорида на­трия. К каждому фрагменту приливают взвесь стандартных эритроцитов. К препаратам, в которых ранее находились сы­воротки анти-А, добавляют взвесь эритроцитов группы А; к препаратам, где ранее была сыворотка анти-В, — эритроциты группы В; к препаратам, где ранее была сыворотка анти-Н, — эритроциты группы 0. Препараты с добавленной взвесью эрит­роцитов помещают во влажные камеры на 3 ч при комнатной температуре. По истечении этого срока на каждый препарат наносят по 1 капле изотонического раствора хлорида натрия, накрывают покровным стеклом и учитывают результат под микроскопом.

*Вариант 2.* Постановку реакции на первом этапе проводят так же, как и в варианте 1, за исключением того, что материал не фиксируют. После проведения абсорбции объекты исследования не промывают и сыворотку не удаляют. На каждый препарат наносят по 1 капле трижды отмытых цельных эритроцитов (соотношение между объемами сыворотки и эритроцитов составляет 20:1). Ингредиенты смешивают стеклянной палочкой, накрывают покровным стеклом и помещают во влажные камеры. Экспозицию в течение 3 ч проводят в холодильнике (4 °С). Затем объекты промывают. Для этого с одной стороны покровного стекла помещают кусок фильтровальной бумаги, с другой — пастеровской пипеткой капельно вводят изотонический раствор хлорида натрия до тех пор, пока вся имеющаяся сыворотка не заменится им. Учитывают только конгломераты эритроцитов, тесно связанные с объектом исследования, которые даже при сильном надавливании на покровное стекло не отходят от объекта.

Этот вариант смешанной агглютинации может быть с успехом использован при определении групповой принадлежности волос; с пятнами крови и выделений такая модификация неможет быть использована из-за получения неспецифическихрезультатов.

**Выявление антигена Р в жидкой крови и пятнах методом РАЭ КРА И**

**Метод выявления антигена Р в пятнах крови реакцией абсорбции – элюции по М. С. Свирскому**

Перед исследованием необходимо подбирать сыворотку анти – Р по активности (титр 1 :128 – 1 : 512 с различными образцами Р + групп) и специфичности (отрицательный результат с эритроцитами Р – группы). По 2 – 3 ниточки длиной 0,5 – 0,7 см из исследуемых пятен крови, предметов – носителей, заведомых образцов крови по Р принадлежности (Р+, Р-) без фиксации (так как спирты полностью разрушают субстанцию Р даже в течение пятиминутного воздействия), слегка расщепленные, абсорбировали в течение 3 – 4 часов гетероиммунной козьей сывороткой анти – Р с титром 1 : 512 в условиях холодильника. Отмывание четырёхкратное охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия. Подсушенные ниточки помещают на предметные стекла и к ним добавляют по 2 – 3 капли 0, 6% взвеси стандартных отмытых эритроцитов группы ОР+ в изотоническом растворе, с помощью которых был установлен титр сыворотки. Элюцию проводят во влажных камерах в течение 20 минут при Т+ 54 – 56ºС. учет результатов проводят с помощью микроскопа после выдерживания препаратов во влажных камерах в течение 2 – 3 часов при комнатной температуре. Наличие агглютинации свидетельствует о присутствии антигена Р в пятне крови. Отрицательный результат реакции в пятне крови не дает эксперту право высказываться об отсутствии антигена Р.

**Метод выявления антигена Р реакцией абсорбции – элюции по М. Ф. Верещаку**

по 2 – 3 ниточки из пятен, предметов – носителей, образцов крови лиц Р+ и Р- групп без фиксации абсорбировали сывороткой анти – Р с титром 1 : 128 – 1 : 256 в течение 20 часов в условиях комнатного холодильника. Отмывание охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия шестикратное. Ниточки после просушивания помещали в пробирки и заливали двумя каплями изотонического раствора хлорида натрия. Элюцию проводили в течении 35 минут при Т+ 53ºС, после чего к элюату добавляли по капле 2% взвеси отмытых стандартных эритроцитов ОР+ группы в изотоническом растворе и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. Учет результатов проводили после центрифугирования пробирок в течение 1 минуты при 1500 об / мин с помощью микроскопа.

Для улучшения результатов реакции стандартные эритроциты можно обработать 0, 01% раствором трипсина в течение 30 минут при Т+ 37ºС, а после экспозиции препаратов при комнатной температуре к осадку эритроцитов добавить 1 каплю 1% раствора бычьего альбумина, или сыворотки АВ группы.

**Метод определение антигена Р в жидкой крови**

для проведения реакции необходимо сыворотки анти - Р не менее 3 серий, стандартные эритроциты Р+ и Р- нескольких доноров, исследуемая кровь (однократно отмытые эритроциты в виде 2% взвеси). Перед работой нужно проверить титр и специфичность сывороток. Титр проверяют с эритроцитами Р + доноров, а специфичность проверяют с эритроцитами Р –. Для проверки титра готовят кратные разведения сыворотки (от 1 : 2 до конечного титра, указанного на ампуле с сывороткой) на физиологическом растворе, к каждому разведению сыворотки добавляют по 1 капле 2% взвеси однократно отмытых стандартных эритроцитов группы ОР + , пробирки встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 часа, затем центрифугируют 1 минуту при 1500 об/ мин. Учет проводят макро- и микроскопически. Специфичность проверяют с эритроцитами доноров Р -, условия проверки аналогично режиму проверки титра, только реакцию ставят с не разведенной сывороткой анти – Р.

Постановка реакции – к 2 каплям сывороток анти – Р в пробирки с соответствующей маркировкой добавляют по 1 капле 2% взвеси однократно отмытых исследуемых эритроцитов, пробирки встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 часа, затем центрифугируют 1 минуту при 1500 об/ мин. Учет результатов макро – и микроскопический.

**Метод выявление антигена Р в пятнах реакцией абсорбции агглютининов (КРА)**

перед постановкой реакции образцы жидкой крови лиц, проходящих по делу, исследуют в жидком виде, а затем эти же образцы исследуют в высушенном виде для определения абсорбционной способности антигена Р и подбора сыворотки анти – Р с высокой частной специфической активностью. Применяют сыворотки анти – Р с титром 1 : 14 – 1 : 16.

Сыворотку титруют по следующей схеме:

Таблица 21

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| разведения | Н | 2 | 4 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 20 |
| Физиологич.  Раствор в каплях |  | 2 | 2 | 2 | 9 | 11 | 13 | 2 | 2 |
| Сыворотка в каплях | 2 | 2 |  |  | 1 | 1 | 1 |  |  |

Пояснения к схеме: из пробирки с разведением «2» после перемешивания переносим 2 капли в разведение «4», из разведения «4» переносим 2 капли в разведение «8», из разведения «8» переносим 2 капли в разведение «16», из последнего разведения удаляем капли. Из разведения «10» после перемешивания переносим 2 капли в разведение «20», а 6 капель удаляем, из разведения «20» 2 капли удаляем. В разведениях «12» и «14» после перемешивания оставляем по 2 капли, а лишние капли удаляем. Навески из пятен, предметов – носителей, заведомых образцов крови Р+ и Р – групп по 50 мг заливают по 0,2 мл подобранного разведения сыворотки с титром 1 : 16 (количественные соотношения навесок и сыворотки анти – Р может быть различным – 25 мг на 0,15 мл, 10 мг на 0,1 мл и т.д.). Пробирки оставляют для абсорбции на 18 – 20 часов при Т+4ºС. Абсорбированные и исходные сыворотки переносят в другие пробирки, центрифугируют при 1500 об/ мин. в течение 5 минут, титруют в смежных разведениях по вышеуказанной схеме. Добавляют в каждое разведение по 1 капле 2% взвеси однократно отмытых стандартных эритроцитов Р+ группы с сильно выраженным свойством. Пробирки встряхивают и оставляют на 2 часа при комнатной температуре, затем центрифугируют 1 минуту при 1500 об/ мин. результаты реакции учитывают после встряхивания пробирок макро –и микроскопически. Снижение титра сыворотки анти – Р в пят не на 3 – 4 ступени, при отсутствии снижения титра сыворотки под влиянием предмета – носителя, свидетельствует о наличии антигена Р. Отрицательный результат реакции не дает основания считать, что исследуемое пятно крови не содержит антигена Р. При выявлении антигена Р в исследуемом пятне крови и и не выявлении его в образце крови лица, проходящего по делу, эксперт имеет право сделать вывод о невозможности происхождения этой крови от данного человека, имеющего группу крови Р -.

**Метод определения антигенов системы MNSs в жидкой крови и пятнах**

Исследование начинают с проверки титра и специфичности сывороток. Реакцию проводят на тарелках или предметных стеклах. Поверхность тарелки разделяют на 3 части двумя горизонтальными параллельными линиями с помощью карандаша по стеклу. В верхнюю часть на одну половину тарелки наносят пастеровской пипеткой по 2 большие капли сыворотки анти-М. В среднюю часть также помещают по 2 больших капли сыворотки анти-N. Рядом с одной каплей сыворотки анти-М помещают небольшое количество цельных отмытых эритроцитов группы ОМ. Соотношение между сывороткой и эритроцитами должно быть равно 1:10. Рядом с другой каплей сыворотки анти-М помещают эритроциты группы 0MN. Соответственно к 1 капле сыворотки анти-N приливают эритроциты группы ON, к другой — группы 0MN. Отметив время по секундомеру, стеклянными палочками или пробирками сыворотки с эритроцитами быстро перемешивают. Покачивая тарелки, при ярком электрическом освещении с помощью лупы наблюдают за временем появления агглютинации. Сыворотки считаются пригодными, если они агглютинируют одноименные эритроциты в пределах 5— 10 с. Для проверки специфичности на нижнюю часть тарелки с одной стороны помещают каплю сыворотки анти-М, а с другой стороны такую же каплю сыворотки анти-N. Около капли сыворотки анти-М помещают каплю эритроцитов группы ON, а возле капли сыворотки анти-М — цельные эритроциты группы ОМ. Сыворотки и эритроциты смешивают стеклянной палочкой и отмечают время по секундомеру. В течение времени наблюдения — 5 мин — агглютинация должна отсутствовать

**Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах крови****реакцией абсорбции—элюци**

Пятна пропитывают 10 *%* альбумином. Из пятна крови и предмета-носителя берут по 2 нити и помещают их на предметные стекла. К одной нити с кровью и предмета-носителя добавляют по 1—2 капли сыворотки анти-М, ко второй — сыворотку анти-N с титром 1:32—1:16. Препараты экспонируют 20 ч при 4 °С во влажных камерах. Затем препараты 5 раз промывают охлажденным (2 °С) изотоническим раствором хлори­да натрия. Для проведения стадии элюции препараты заливают 0,2 % взвесью трижды отмытых стандартных эритроцитов на 1 % растворе проверенного альбумина1. К препаратам, в которых ранее находилась сыворотка анти-М, добавляют взвесь эритроцитов группы М; к препаратам, в которых ранее находилась сыворотка анти-N, — взвесь эритроцитов группы N. Препараты с добавленной взвесью эритроцитов помещают во влажные камеры и экспонируют в термостате 30 мин при 52 °С, а затем еще 1,5 ч выдерживают при комнатной температуре. Перед учетом результатов к каждому препарату приливают по 1 капле изотонического раствора хлорида натрия, пре­параты накрывают покровным стеклом и микроскопируют

**Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах кровиреакцией абсорбции—элюциис помощью элюата.**

Для получения элюата подбирают образцы крови, содержащие сильный фактор N (гомозигота N/N), обладающие большой абсорбционной способностью. Каждый образец вначале исследуют в жидком виде. Для этого на предметные стекла помещают по 1 капле сыворотки анти-М и анти-N. К ним добавляют по 1 капле трижды отмытых эритроцитов групп М и N. Если с сывороткой анти-N в течение 5 с наступает сильно выраженная агглютинация эритроцитов, видимая невооруженным глазом, при отсутствии таковой с сывороткой анти-М в течение 5 мин, такой образец может быть использован для приготовления элюата. Проверенный таким образом образец крови выливают на марлю и высушивают при комнатной температуре. Давность образца крови не должна превышать 3 дней. К навеске 50 мг образца крови, помещенного в агглютинационную пробирку, добавляют 0,3 мл сыворотки анти-N. Экспозиция составляет 4 ч при 4 °С. Спустя указанный срок абсорбированную сыворотку отсасывают и к навеске пятна крови добавляют новую порцию сыворотки анти-N той же серии и в том же объеме. Время второй абсорбции составляет 18—20 ч в тех же условиях. Спустя указанное время сыворотки отсасывают. Пятна крови 5 раз промывают охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия. Элюцию проводят 0,2 мл изотонического раствора, который добавляют к отмытому материалу. Пробирки помещают на 30 мин при 52 °С, затем 1,5 ч выдерживают при комнатной температуре. Изотонический раствор отсасывают и помещают в другие пробирки.

Нити из пятна крови и предмета-носителя помещают на предметные стекла и заливают 1—2 каплями элюата. Предметные стекла помещают во влажные камеры и выдерживают 20 ч при 4 °С. После фазы абсорбции нить 1 раз слегка Промывают охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия. Затем к этому раствору добавляют I каплю 0,2 % взвеси трижды отмытых эритроцитов группы N с сильно выраженным фактором N (0,2 % взвесь эритроцитов готовят на 1 % растворе проверенного альбумина). Препараты выдерживают 30 мин при 52 °С, затем 2 ч при комнатной температуре. На предметное стекло наносят каплю изотонического раствора хлорида натрия, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

**Метод определения антигенов системы MNSs в пятнах крови****реакцией смешанной агглютинации.**

Нити из пятен крови и предмета-носителя делят на 2 части и помещают на предметные стекла. К одному фрагменту добавляют сыворотку анти-М, к другому — сыворотку анти-N с титром 1:32—1:16. Предметки анти-N приливают эритроциты группы ON, к другой — группы 0MN. Отметив время по секундомеру, стеклянными палочками или пробирками сыворотки с эритроцитами быстро перемешивают. Покачивая тарелки, при ярком электрическом освещении с помощью лупы наблюдают за временем появления агглютинации. Сыворотки считаются пригодными, если они агглютинируют одноименные эритроциты в пределах 5— 10 с. Для проверки специфичности на нижнюю часть тарелки с одной стороны помещают каплю сыворотки анти-М, а с другой стороны такую же каплю сыворотки анти-N. Около капли сыворотки анти-М помещают каплю эритроцитов группы ON, а возле капли сыворотки анти-М — цельные эритроциты группы ОМ. Сыворотки и эритроциты смешивают стеклянной палочкой и отмечают время по секундомеру. В течение времени наблюдения — 5 мин — агглютинация должна отсутствовать

**Определение системы гаптоглобина (Нр) в жидкой в пятнах крови**

**Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в жидкой крови**

Для определения Нр в жидкой крови требуется провести следующие операции.

**Приготовление** **растворов**

для малых камер для больших камер

*Акрис*

Акриламид — 30 г Акриламид — 150 г

Бисакриламид — 1 г Бисакриламид — 5 г

Вода дистиллированная — до Вода дистиллированная — до

100 мл 500 мл

Трис — 1,5 г Глицин — 8.5 г

*Электродный буфер рН 8,3—8,35*

*Г&квый буфер рН 9,15—9,25*

Вода дистиллированная — 100 мл

HCI (кони.) — 5,5 мл

Трис — 73,2 г

ТЭМЕД-0,92 мл

По мере растворения довести объем до 200 мл в мерной посуде.

**Приготовление геля (6,9 %)**

для малых камер для больших камер

Акрис — 11,5 мл Акрис — 23 мл

Гелевый буфер — 6 мл Гелевый буфер — 12 мл

Дистиллированная вода — Дистиллированная вода — 65 мл

32,5 мл

Персульфат аммония — 33 мг Персульфат аммония — 70 мг

Приготовление красителя

Уксусная кислота 10 % — 100 мл

Бензидина хлорид — '/, скальпеля

Пергидроль — 6—8 капель (вносить перед окраской)

Пригбтовление образцов

Сахароза 60 %, водная — 5 мкл НЬ (гемоглобин) — 5 мкл Сыворотка — 15 мкл

Для приготовления гемоглобина используют эритроциты фенотипа Нр 1-1, которые 8 раз промывают изотоническим раствором хлорида натрия. К осадку добавляют несколько капель дистиллированной воды, затем пробирку помещают на 1 сут в морозильник.

Сахарозу (1,5 г) растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды. При работе с гемолизированнои трупной кровью кровь разводят в соотношении 2:1 и помещают в морозильную камеру. К 130 мкл гемолизата, помещенным в пробирку, добавляют 0,5 мл хлороформа, смесь интенсивно перемешивают, центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин. Супернатант отделяют, к нему прибавляют 20 мкл водного раствора сахарозы, вносят весь объем.

***Проведение электрофореза и окрашивание фореграммы****.* Повер­хности стекол должны быть тщательно отмыты и высушены (нельзя допускать наличие пятен и подтеков). После сборки гелевого блока и заливки в него смеси мономеров для формирования карманов вставляют шаблон (гребенку). Полимеризация геля происходит в течение 30—40 мин при толщине геля 3 мм. После окончания полимеризации прибор собирают, заливают электродный буфер. Гребенку и изолирующую прокладку со стороны анода удаляют. Перед внесением образцов в карманы проводят преэлектрофорез в течение 30—40 мин при напряжении 60—80 В. Образцы в карманы вносят под электродным буфером. Одновременно с опытными образцами вносят контрольный образец. Затем блок помещают в холодильник <ТЬ п подключают ток. Время разгонки 3,5—4 ч, напряжение 250-300 В, сила тока 15—20 мА, причем в первые 5 мин напря­жение (вольтаж) должно быть не более 120 В.

После окончания электрофореза блок извлекают из камеры, буфер сливают в емкость. Разгерметизировав ячейку, фореграмму снимают со стекол. Фореграмму окрашивают в кювете: фореграмму заливают раствором бензидина, краситель готовят непосредственно перед окрашиванием. Через 20—30 мин проводят определение типов Нр.

Типирование фенотипов лучше проводить при помощи негатоскопа (размер экрана 20x30 см). Гель помещают на стеклянную пластинку, фракции опытных образцов типируют, сравнивая их с контрольными. Фореграмму фотографируют или высушивают. В последнем случае гель, помещенный на стеклянную пластинку, накрывают смоченным водой целлофаном, удаляя пузырьки воздуха, края целлофана подворачивают под пластинку. Через 1—2 сут гель высыхает до тонкой пленки, которая легко отделяется от стекла и остается на целлофане. Повторное исследование проводят в следующих случаях: если не выявлены или плохо дифференцируются фракции; весь блок целиком прокрашивается бензидином (от линии старта до фракции НЬ); имеются искажения в расположении белковых зон.

***Учет результатов****.* На фореграмме выявляют зоны Нр (аль-фа-гликопротеидов). Фенотип Нр 1 — 1 представлен единичной ярко выраженной, плотной фракцией. Он располагается над полосой НЬ. Фенотипы Нр 2—1 и 2—2 имеют многочисленные фракции с разной электрофоретической подвижностью. Гомо­зиготный фенотип Нр 2—2 не представлен отдельным компонентом. Фракций в фенотипе Нр 2—2 при разных условиях разделения может быть до 10, а в фенотипе Нр 2—1 — более 10. Иногда все фракции отсутствуют. Это явление называется агаптоглобинемией, однако это не следует путать с низ­ким содержанием гаптоглобина, которое может быть как при заболевании, так и различных физиологических состояниях организма. Подобные случаи требуют повторного исследования с обязательным введением в реакцию контрольных образцов. Группы Нр крови определяют путем сопоставления уровней расположения фракций исследуемых и контрольных образцов.

**Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в пятнах крови**

Раствор для экстрагирования пятен крови (на марле или других носителях) готовят следующим образом: 3 г сахарозы смешивают с 20 мл электродного буфера (рН 8,3—8,35); хранят в холодильнике. Кусочек пятна кропи п контрольного участка предмета-носителя размером |х| см каждый измельчают, помещают в агглютинационные пробирки, заливают 5—7 каплями экстрагента и оставляют на ночь при комнатной температуре. На следующий день экстракт отсасывают, центрифугируют I ч при 4000 об/мин. Супернатант вносят в карман геля в количестве 50 мкл.

Реагенты для приготовления двухслойного геля используют те же, что и при определении Нр в жидкой крови.

**Приготовление двухслойного геля**

для малых камер для больших камер

*1-й слой — разделяющий, S %*

Акрис — 13,6 мл Акрис — 15 мл

Гелевый буфер — 9,45 мл Гелевый буфер — 10 мл

Дистиллированная вода — 27 мл Дистиллированная вода — 30 мл

Персульфат аммония — 40 мг Персульфат аммония — 55 мг

*2-й слой* — *концентрирующий*

Акрис — 1,5 мл Гелевый буфер — 1,2 мл Дистиллированная вода — 7,3 мл Персульфат аммония — 10 мг

Первый слой должен быть в ячейке на 1,5 см ниже верхнего слоя. Верхний край геля подравнивают, для чего в ячейку приливают воду с таким расчетом, чтобы слой воды был ра­вен 2—3 мм. Полимеризация длится 40—60 мин. Перед внесением второго слоя геля воду удаляют и верхний край геля высушивают фильтровальной бумагой. После добавления второго слоя вставляют гребенку. Полимеризация продолжается 40—60 мин. Внесение образцов крови см. выше. Первоначально напряжение должно быть 80 В, затем по мере продвижения образцов через концентрирующий гель устанавливают напряжение 250 В. Высота электрофоретических фракций должна быть не менее 6—7 см. Затем гель извлекают из ячейки и красят бензидином.

Необходимо помнить, что экстракцию пятен крови давности более 2 мес производят с использованием 1 % раствора фибринолизина, 10 мг фибринолизина (20 000—30 000 ед.) растворяют в 1 мл смеси электродного буфера и 15 % раство­ра сахарозы (готовить перед употреблением). Кусочки из пятен размером 1 — 1,5x1,5 см измельчают, добавляют 8—10 капель фибринолизина. Экстрагирование происходит при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем объекты центрифугируют в течение 1 ч при 4000 об/мин. В каждый карман вносят по 10 мкл (рис.9).

**Метод определения системы гаптоглобина (Нр) в крахмально-агаровом геле.**

Навески крах­мала по 25 г в стеклянных стаканах оставляют на 5 сут в тер­мостате при 56 °С. Затем их заливают смесью ацетона и соля­ной кислоты (75 мл ацетона + 10,9 % НС1). Смесь должна постоять I сут в термостате при 56 "С. Для гидролиза берут 30 мл смеси, контакт с крахмалом длится от 3 до 30 мин; вре­мя гидролиза зависит от сорта крахмала.

Для проведения электрофореза готовят 13—15 *%* гель на гелевом буфере. Для приготовления гелевого боратного буфера берут 0,93 г борной кислоты, 0,67 г гидроксида натрия и объем доводят до 1 л дистиллированной водой (рН 11,0). Перед употреблением гелевый буфер разводят 1:1 дистиллированной водой; У4 буфера доводят до кипения, в оставшейся части буфера разводят крахмал, который затем наливают струей в разогретый буфер, постоянно помешивая. Гель заливают в ванночки, после полного его остывания проводят электрофо­рез. При этом применяют электродный буфер следующего состава: борная кислота — 9,3 г; гидроксид натрия — 1,2 г: дистиллированная вода — до 1 л.

К 10 каплям сыворотки добавляют 1 каплю раствора гемоглобина. Кусочки фильтровальной бумаги смачивают смесью сывороток и раствора гемоглобина и вносят в надрезы, сде­ланные в геле. Электрофорез осуществляется при силе тока 20 мА и напряжении 150—200 В. Через 15—20 мин после начала электрофореза ток выключают и из геля извлекают фильтровальную бумагу, смоченную объектом исследования. Весь электрофорез длится 3—4 *ч.*

Для выявления фракций гемоглобина используют смесь бензидина и перекиси бария и соотношении 1:4 или смесь беизидина и перекиси водорода. Блок разрезают продольно металлической проволокой.

Для проведения электрофореза в крахмальном геле можно пользоваться трис-лимонным гелевым буфером, следующего состава: трис — 3,41 г, лимонная кислота — 0,6 г, дистиллированная вода — до 1 л (рН 8,65). При этом электродный буфер должен иметь состав: гидроксид натрия — 2,5 г, бор­ная кислота — 18,5 г, дистиллированная вода — до 1 л (рН 8,5).

Выявление Нр в крахмально-агаровом геле. Агар в количестве 2 г (фирмы «Difko» или «Bacto») разводят 270 мл разведенного гелевого боратного буфера. Смесь прогревают на водяной бане; 20 г крахмала разводят в 30 мл того же буфера. В колбу с агаром постепенно при постоянном помешивании приливают крахмал в гелевом буфере. Полученную смесь выливают в кювету. Далее — см. предыдущий раздел.

**Метод установления групповой принадлежности выявлением антигенов А и В количественной реакцией абсорбции изогемагглютининов**

**Введение**

В первую очередь исследуют образцы крови известных групп, затем образцы крови лиц, проходящих по делу, после чего приступают к определению крови в пятнах на вещественных доказательствах.

**Постановка реакции**

Реакцию проводят следующим образом. К 50 мг навески крови и к 50 мг навески из предмета-носителя, помещенных в пробирки, добавляют по 0,3 мл изосывороток анти-А и анти-В. Пятна крови и материала предмета-носителя должны быть предварительно измельчены. Сыворотка должна смочить материал и остаться в незначительном избытке. С этой целью концом пастеровской пипетки смешивают измельченный материал с сывороткой. Ингредиенты оставляют на 18—20 ч в холодильнике, затем сыворотку отсасывают, центрифугируют и титруют указанным выше способом. Для данной реакции оптимальным является титр 1:32. Регистрацию полученных данных производят указанным выше способом. Приведем схему записи полученных данных в рабочей тетради.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | Проверка работы сывороток | |  |
| **н** | 2 | 4 | 8 | 16 32 64 128 256 | 512 |
| © | © | + | + | +- -+ - - - | анти-А |
| © | © | © | + | + +- - - - | анти-В |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | Кровь | гражданина П. (на марле) |  |
|  |  |  |  |  | анти-А |
| © | © | + | + | + + - - - - | — анти-В |
|  |  |  |  | Предмет-носитель |  |
| © | © | + | + | **+- -+ - - -** | — анти-В |
| © | © | + | + | + +- - - - | — анти-В |

В случаях, когда показатели абсорбции оказываются низкими, реакцию повторяют с теми же сыворотками в большем разведении, «приводящем» их к титру 1:16, и прибегают к развернутому титрованию исходных и абсорбированных сывороток (разведение в 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 14 и 16 раз) или применяют гетероиммунные сыворотки анти-А и анти-В. Иммунные сыворотки используют также в титрах 1:32 (кратное титрование) и 1:16 (развернутое титрование). Реакцию абсорбции с иммунными сыворотками осуществляют так же, как и с изосывороткам и анти-А и анти-В. Разведения при подборе титра сыворотки 1:32 осуществляют кратным титрованием. За­тем сыворотки переносят на плоскость (фарфоровые тарелки) и к каждому разведению добавляют (концом пастеровской пипетки) небольшое количество трижды отмытых стандартных эритроцитов. Кровь и сыворотку размешивают стеклянной па­лочкой или дном агглютинационной пробирки. Экспозиция составляет 5 мин, в течение этого времени ведут наблюдение при постоянном покачивании тарелки:

Обнаружение агглютиногена Н осуществляют таким же способом, как и выявление антигенов А и В с помощью иммунных сывороток анти-А и анти-В. В качестве реагентов могут быть использованы сыворотки анти-Н, лектин из семян бузины травянистой, бобовника и ракитника.

**Метод выявления антигенов А, В, Н в гнилостно – измененных мышцах реакцией абсорбции – элюции**

**Подготовка материала**

Кусочки мышцы промывают под проточной водой в течение 20 – 30 минут с последующей обработкой в кипящем 10 % растворе формалина в течение 3 минут и выдерживания в этом же растворе в течение 1 часа. Промывают от формалина в течение 10 часов в проточной воде. Кусочки мышцы высушивают и заливают с умеренным избытком изогемагглютинирующими сыворотками анти-А, анти-В с титром 1:64, анти-Н с титром 1:64 .

**Абсорбция**

Абсорбция в течение 4 часов при Т+4°С с последующим четырёхкратным отмыванием охлажденным физиологическим раствором.

**Элюция**

Элюция в пробирках в 2 каплях физиологического раствора в течение 20 - 25 минут при Т+52°С . После остывания кусочки мышцы извлекали, к элюату добавляли по 2 капли 0,5 % взвеси стандартных эритроцитов групп А, В, 0. Центрифугирование в течение 4 минут при 1500 об/ минуту. Контрольные опыты: к кусочкам мышцы, инкубированным изогемагглютинирующими сыворотками анти-А и анти-В, добавляли эритроциты группы 0.

**Учет результатов микроскопический.**

Учитывается агллютинация с соответствующей группой по системе АВ0.

**Выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах**

**Метод выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах реакцией смешанной агглютинации (по методу Колыш)**

Тканевые срезы гистологических препаратов заливают на 20 минут ксилолом и растирают в смеси этанола и эфира в соотношении 1: 1, затем центрифугируют в 3 порциях этанола по 5 минут при 1500 об/минуту. Ресуспензированные в этаноле осадки наносят на предметные стекла, высушивают и фиксируют в течение 10 минут метанолом.

Абсорбцию проводили изогемагглютинирующими сыворотками анти-А, анти-В с титром 1: 256 – 1: 512, анти-Н с титром 1: 64 в течение 20 часов в условиях комнатного холодильника. Отмывание в 5 порциях охлажденного физиологического раствора по 20 минут. На высушенные препараты наносят 0,2 % взвесь стандартных эритроцитов групп А и В и 0,3 % взвесь стандартных эритроцитов группы 0 с добавлением альбумина. Экспозиция при комнатной температуре во влажных камерах в течение 1 – 6 часов.

Учет микроскопический.

**Метод выявления антигенов А, В, Н в гистологических препаратах реакцией абсорбции - элюции (по методу Свирского, Богуславского)**

Гистологические препараты на предметных стеклах обрабатывали ксилолом (ацетоном), промывали в изотоническом растворе хлорида натрия. К кусочкам среза размером 3 х 3 мм добавляли по 2 капли изогемагглютинирующих сывороток анти-А серий …, анти-В серий …, с титром 1: 300. Абсорбция в течение 20 часов при Т+4°С с последующим 3 кратным отмыванием охлажденным физиологическим раствором. Кусочки переносили на предметные стекла и к ним добавляли по 3 капли 0,3 % взвеси стандартных эритроцитов групп А, В, О. Элюция в течение 15 минут при Т+56°С. Учет результатов микроскопический через 2 часа выдерживания препаратов во влажных камерах при комнатной температуре. Результаты реакции отражены в прилагаемой таблице.

**Метод подготовки фрагментов костей, ногтей и зубов для выявление антигенов системы АВ0**

**Введение материала в реакцию:**

а) в нефиксированном виде;

б)фиксированным спиртом (метанол, этанол, бутанол);

в) фиксированным кипячением в дистиллированной воде:

г) в ряде случаев предварительно обработанным либо смесью Никифорова, либо 1% трипсином

- исследуется порошок (редко), крупные и мелкие кусочки объекта;

- абсорбция практически всегда не менее 18ч при температуре вхолодильнике 5 - 6 С.

-пятикратное отмывание охлажденным физиологическим раствором хлорида натрия:

* элюция:
* а) на предметных стеклах (порошок) или в пробирках во взвесь эритроцитов на 1% человеческом или бычьем альбумине, иногда на сыворотке группы АВ;
* б) в пробирках в физиологический раствор (наиболее часто). Температура термостата составляет 45 - 50 С.

- в качестве реагентов при абсорбции всегда используются изосыворотки анти - А и анти - В различных серий в титре 1 : 128; в отдельных случаях гетероиммунные сыворотки анти - А и анти - В . Для выявления антигена Н применяют либо моноклональную сыворотку анти -Н в титре 1 : 128, либо экстракт бузины в таком же титре.

Например, фиксация бутанолом или работа с нефиксированным материалом часто отрицательно сказывется на конечном результате, особенно при работе с опилками. В тех же случаях, когда вместо опилок в работу вводят объекты в виде мелких кусочков и фиксируют их кипячением в дистиллированной воде, положительный результат более, чем в 75 - 80%

-эффективность работы значительно повышается, если перед кипячением (иногда и после него) объекты выдерживали в смеси Никифорова.

Стойкие положительные результаты получены при элюировании в физиологический раствор.

На результатах исследования, безусловно, отражается загрязненность объектов посторонними наложениями, и поэтому к отчистке материала следует подходить очень тщательно. Кость или зуб должны быть отмыты, механически очищены от наложений, помещены в дистиллированную воду иногда с добавлением 10% раствора уксусной кислоты или 1% раствора трипсина. Время нахождения объектов в указанных растворах до фиксации может достигать несколько суток.

Имеет значение и вид кости - плоские, трубчатые, губчатые. Для работы наименее подходят губчатые кости, дающие либо неспецифические результаты, либо гемолиз эритроцитов. Результаты исследований с плоскими и трубчатыми костями приблизительно одинаковые, существенных различий в выявлении антигенов в них не обнаружено.

В значительной мере результаты зависят и от исходной групповой принадлежности изучаемого материала, от выраженности антигенов в нем. Так, наиболее стойкие результаты получены при работе с группами 0 и В. Группы А и АВ требуют особого подхода поскольку при работе с ними в ряде случаях не выявляется антиген А из - за его слабой выраженности В подобных случаях требуется неоднократное повторение реакций в различных их вариантах.

**Техника подготовки материала**

1.Исследованию следует подвергать объекты в виде мелких кусочков, не превращая последние в порошкообразное состояние.

2.Фрагменты костей, зубов, ногтей предварительно следует подвергнуть тщательному отмыванию (до 20-40 ч. в дистиллированной воде с последующим подсушиванием при комнатной температуре).

3.Объекты от эксгумированных трупов после отмывания необходимо поместить на некоторое время (в зависимости от состояния материала) в смесь Никифорова.

4.Следует проводить фиксацию кусочков кипячением в дистиллированной воде не менее 15 мин (при наличии значительного загрязнения или гнилостных изменений длительность фиксации может быть увеличена). При работе со свежим материалом возможна и фиксация метанолом.

5.Наиболее эффективно на стадии абсорбции использовать изосыворотки анти - А и анти - Вв титре 1:128 и растительный реагент или моноклональную сыворотку анти - Н в таком же титре. Время абсорбции не менее 18ч., однако его можно и несколько продлить, если позволяет материал.

6.Необходимо 5 - кратное отмывание охлажденным физиологическим раствором хлорида натрия.

7.Часть материала целесообразно элюировать в пробирках в физиологический раствор в термостате при температуре 48-50°С в течение 25-30 мин., а оставшуюся часть - в 2% раствор глицина. Время элюирования в глицин 15-20 мин температура термостата 48-52°С.

Далее при элюировании в физиологический раствор хлорида натрия к элюатам добавляют соответствующие эритроциты в 1% взвеси (иногда на альбумине) и проводят центрифугирование. Элюаты с глицином после добавления эритроцитов оставляют на 30 мин. в холодильнике и лишь затем учитывают результаты невооруженным глазом и с помощью микроскопа.

8.Для проведения исследований предпочтительнее брать плоские и трубчатые кости, от зубов - кусочки ткани под эмалью.

9.Учитывая сложность работы с материалом в виде фрагментов костей, ногтей и зубов, необходимо во всех без исключения случаях вводить в реакцию известные в групповом отношении образцы аналогичных объектов всех групп по системе АВО, а также, если это возможно, запрашивать иные объекты изучаемого человека (пот, волосы: кровь членов его семьи, сведения о группе крови по документам). При наличии подобных контролей эксперт приобретает большую уверенность, необходимую ему для решения вопросов следствия. Получение противоречивых результатов при изучении одного и того же объекта должно насторожить эксперта. Его выводы в подобной ситуации носят весьма предположительный характер.

10.При работе с обгоревшими останками нецелесообразно брать в работу материал в состоянии белого и серого каления. Результаты проведенных опытов свидетельствуют о том, что только при черном калении в некоторых случаях еще можно достичь положительных результатов, и, следовательно, такие объекты подлежат исследованию.

**Выявление групповых антигенов А, В, Н в костной ткани**

**Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костной ткани методом реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации.**

Кусочки костей измельчаем до порошкообразного состояния, заливаем 10% раствором альбумина до полного его высыхания, затем помещаем в агглютинационные пробирки. К 40 мг костной ткани прибавляем 0,2 мл сывороток. Применяем изосыворотки анти-А, анти-В с титром 1:32 и иммунную сыворотку анти-Н с титром 1:16. Абсорбция 48 часов при Т+4С. Исходные и абсорбированные изосыворотки титруем кратно, в каждое разведение добавляем по одной капле 1% взвеси стандартных эритроцитов А и В с последующим центрифугированием и микроскопическим учетом. Исходную и абсорбированную сыворотку анти-Н титруем в смежных разведениях и смешиваем на плоскости с каплей стандартных эритроцитов в соотношении 20:1. Учет результатов в течение 5 минут.

**Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях реакцией абсорбции – элюции (по Гуртовой)**

Кусочки костей по 7 мг из **об.** ..., образцы костей групп А, В, О помещали в пробирки и добавляли по 3 капли изогемагглютинирующих (гетероиммунных, моноклональных) сывороток анти-А серии ..., анти-В серии ... с титром…, экстрактом бузины травянистой (цоликлоном анти-Н) серии ... с титром …. Абсорбция 18 часов при Т+4°С. Абсорбированные косочки отмывали физиологическим раствором. Элюцию проводили в пробирках в физиологический раствор в термостате при Т+52°С в течение 30 минут. Элюаты переносили в чистые пробирки и добавляли по 1 капле 0,5 % взвеси стандартных эритроцитов групп А, В, О, приготовленной на 1 % растворе альбумина (или на сыворотке человека АВ группы). Учет результатов микроскопический после центрифугирования в течение 4 минут при 1500 об/минуту. Результаты реакции отражены в прилагаемой таблице.

**Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях на бляшках реакцией абсорбции – элюции**

Из костных опилок **(об.** …), образцов костей групп А, В, О и клея БФ – 6 готовили бляшки, которые после высыхания абсорбировали изосыворотками (гетероиммунными, моноклональными) анти-А серий ..., анти-В серий ... с титром … и экстрактом бузины травянистой (цоликлоном анти-Н) серий … с титром … . Абсорбция в течение 18 часов при Т+4°С. Отмывание охлажденным физиологическим раствором 6 раз, для выявления антигена Н - 3 раза. Элюциюпроводили в 0,5 % взвесь стандартных эритроцитов групп А, В, О, приготовленную на 1 % растворе альбумина, в термостате при Т+50°С в течение 30 минут, (для антигена Н - 20 минут). Учет результатов микроскопический через 2 часа выдерживания препаратов во влажных камерах при комнатной температуре. Результаты реакции отражены в прилагаемой таблице.

**Метод выявления групповых антигенов А, В, Н в костях реакцией абсорбции - элюции (по Стегновой)**

Из промытых и обезжиренных костных кусочков **об.** ..., заведомых образцов костей групп А, В, О готовили навески по 7 мг, абсорбировали 2 - 3 каплями изосывороток (гетероиммунных, моноклональных) анти-А серии ..., анти-В серии ... с титром … и экстрактом бузины травянистой (цоликлоном анти-Н ) серии ... с титром .…. Абсорбция при Т+4°С в течение 18 часов. Отмывание охлажденным физиологическим раствором 2-3 раза с применением центрифугирования по 10 минут при 1500 об/минуту. К осадкам добавляли по 2 капли физиологического раствора. Элюцию проводили в термостате при Т+45°С в течение 30 минут. К элюатам добавляли по 1 капле 0,5 % взвеси стандартных эритроцитов, приготовленной на 1 % альбумине. Центрифугирование 2 мин. при 1500/об минуту. Учет результатов микроскопический. Результаты реакции отражены в прилагаемой таблице.

**Метод исследования гнилостно измененных следов крови и выделений человека**

**Введение**

При проведении судебно-биологической экспертизы вещественных доказательств одним из наиболее трудных для исследования объектов являются следы, образованные смешением крови и выделений разных лиц. Сложность экспертизы возрастает при наличии в материале гнилостных изменений, когда серологическими реагентами нередко выявляются и антигены, свойственные микроорганизмам.

Аналогичные сложности возникают и при исследовании выделений из открытых полостей тела человека - ротовой, вагинальной, анальной, так как в таком материале всегда содержится большое количество микрофлоры. Наличие у микроорганизмовсерологической активности, искажающей истинный фенотип индивидуума, обусловливает в ряде случаев кажущееся несовпадение антигенных характеристик крови и выделений одного и того же человека.

Поскольку бактериальные загрязнения вещественных доказательств сказываются на результатах судебно-медицинской экспертизы, необходимо помнить о возможном влиянии антигенной активности микрофлоры на иммунологические реакции и придерживаться определенной тактики исследования.

В ряде случаев бактериальное загрязнение становится очевидным уже на первых этапах проведения экспертизы. Об этом свидетельствуют следующие факты:

1.Обстоятельства дела - нахождение вещественных доказательств даже в течение непродолжительного времени в условиях, благоприятных для развития микрофлоры (влажная среда, высокая температура): длительное хранение вещественных доказательств.

1. Визуальные признаки гнилостных изменений, характерный запах,
2. Выявление в цитологических препаратах (приготовленных для обнаружения спермы) значительного количества микроорганизмов.

При иммунологическом исследовании на антигенную активность микрофлоры могут указывать следующие признаки:

1.Отсутствие снижения титра антител диагностической сыворотки после "нагрузки" агглютининами при положительном исходном результате реакции абсорбции - ингибиции с выделениями.

2.Невоспроизводимость результатов реакции абсорбции-элюции(РАЭ) при исследовании различных участков пятна (вследствие неравномерной обсемененности материала микроорганизмами).

3.Свечение микроорганизмов - положительный результат реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

Следует отметить, что даже при значительной загрязненности пятна микрофлорой контрольные участки предмета-носителя могут не

влиять на примененные серологические реагенты. Это обусловлено тем, что в отсутствие белкового субстрата размножение микроорганизмов происходит менее интенсивно и их серологическая активность может не выявляться.

Наиболее простым техническим приемом, обеспечивающим инактивацию микрофлоры, является обычная **стерилизация:**прогревание и кипячение материала. Кипячение, как правило, оказывается более эффективным, так как помимо термического воздействия на микроорганизмы обеспечивает их экстрагирование из исследуемого, пятна. Хороших результатов нередко можно добиться промыванием материала.

Эффективным способом удаления "привнесенных" антигенов из экстрактов является "скоростное" **центрифугирование,** при котором происходит осаждение клеточных элементов, в том числе и бактерий, обеспечивающее выявление в экстракте только водорастворимых антигенов крови и выделений человека.

Высокая специфичность результатов РАЭ достигается при предварительной обработке материала ферментным раствором **(трипсин)** и использовании моноклональных антител анти-А и анти-В. Эффект указанной обработки связан с разрушением или блокадой антигенных рецепторов микроорганизмов протеолитическим ферментом, а также с их интенсивным экстрагированием из пятна в раствор.

**Подготовка материала**

Правильная подготовка материала к исследованию является важнейшим этапом экспертизы. Наряду с этим большое значение имеют и другие методические аспекты исследования:

-правильный выбор титра диагностических реагентов, продолжительности абсорбции;

-использование методов с различной чувствительностью (реакции абсорбции-ингибиции и РАЭ);

-применение РИФ, позволяющей устанавливать принадлежность выявленных антигенов сперматозоидам, клеткам буккального и вагинального эпителия;

-использование различных диагностических реагентов (изо- и гетероиммунных сывороток, моноклональных антител), поскольку они могут обладать неодинаковым авидитетом.

Учет воздействия антигенной активности микрофлоры на серологические реагенты, знание особенностей исследования бактериально загрязненного материала позволяют выявлять при экспертизе крови и выделений лишь те антигены, которые свойственны организму человека.

**Способы предварительной обработки материала при исследовании бактериально загрязненных пятен**

1.Прогревание в термостате при +120°С в течение 1 ч.

2.Кипячение в дистиллированной воде в течение 30 мин.

3.Промывание в физиологическом растворе при 1-4°С в течение 18 ч.

4.Центрифугирование экстрактов из исследуемого материала (микроцентрифуга типа "Eppendorf") в течение 5 мин при 12 тыс. об/мин и исследование надосадочной жидкости РАЭ.

5.Ферментная обработка при использовании моноклональныхантител анти-А и анти-В в РАЭ: добавление к нитям со следами крови и выделений 0,1% -ного раствора трипсина с рН 7,2; энзимирование в термостате при 37°С в течение 30 мин; отсасывание раствора трипсина двукратное промывание нитей физиологическим раствором и высушивание на фильтровальной бумаге.

При любом способе предварительной обработки материала следует сопоставлять результаты выявления групповых антигенов как до, так и после обработки. Резкое снижение или отсутствие активности какого-либо реагента по отношению к антигенам следа, подвергшегося обработке, свидетельствует об инактивации антигенов микрофлоры.

Способы 4 и 5 позволяют практически полностью освободиться от влияния "привнесенных" антигенов, а способ 3 необходимо сочетать со способом 1 или 2.

**Перечень использованных источников:**

1. Сборник материалов по судебно- медицинской экспертизе.-М.,1960.
2. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) – Астана, 2010
3. Письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава РСФСР б/н от 1993г. Памятка по объему и пределам необходимых исследований при проведении экспертизы вещественных доказательств (биологических объектов крови, спермы, пота, мочи, ногтей, гистологических и цитологических препаратов). –М, 1993. -8с
4. «Исследование вещественных доказательств» Томилин. М.1962.

5.Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Выявление антигенов А,В,Н в следах крови реакцией абсорбции-элюции с применением моноклональных антител.-М., 1989.-7с.

6.Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Применение моноклональных антител анти-А, анти-В и анти- Н для определения групповой принадлежности жидкой крови в судебно- медицинской практике.-М.,1989.-6с.

7.Методические рекомендации Минздрава УССР.№ 27 от 1978г.

По определению фенотипов Hb А в жидкой крови. –Одесса, 1978-21 с.