

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



МЕТОДИКА

ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ДИАТОМОВОГО ПЛАНКТОНА
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ УТОПЛЕНИЙ

(шифр специальности – 24.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика исследования на наличие диатомового планктона при диагностике утоплений
2. Шифр специальности методики	24.1(11)
3. Информация о разработчике методики	Составитель: Оспанова К.Е. - судебно-медицинский эксперт-гистолог, к.м.и. Центр судебной медицины МЗ РК Рецензент: Манекенова К.Б. - заведующая кафедрой патологической анатомии МУА, профессор, д.м.н.
4. Сущность методики	Выявление диатомового планктона при утоплении
4.1. Объекты исследования	Аутопсийный материал (фрагменты внутренних органов и частей трупа, забор которых производится во время вскрытия)
4.2. Методы исследования	Световая и поляризационная микроскопия
4.3. Краткое поэтапное описание методики	A. Исследование воды. После описания полученных объектов приступают к исследованию образца воды. Для этой цели вода разливается в центрифужные пробирки (в соответствие с количеством гнезд центрифуги), в которых и центрифицируется (на ручной центрифуге 10-15 минут, на электрической, при 3 тысячах оборотов 2—3 минуты). Для концентрирования осадка можно применить «метод обогащения», заключающийся в том, что из каждой пробирки, после центрифугирования, пипеткой отсасывается около $\frac{3}{4}$ объема жидкости, наливается новая порция исследуемой воды и центрифугирование повторяется; так можно производить объединение всех порций осадков из присланного образца. Полученный суммарный осадок подвергают микроскопическому исследованию сначала при малом (80), а затем при большом (160 и более) увеличении. На предметное стекло наносятся на расстоянии не менее 1 см друг друга 2—3 капли осадка, на которые накладываются покровные стекла. Для установления наличия диатомовых

	<p>водорослей и ориентировочного определения семейства или рода следует просмотреть не менее 10—15 препаратов,</p> <p>Б. Исследование легочной ткани. Исследование легочной ткани производится для выяснений наличия или отсутствия в ней диатомового планктона, сходства или различия его с обнаруженным в образце воды и для получения данных с целью сопоставления их с планктоном, найденным в других внутренних органах. В основе исследования легочной ткани лежит метод Ревенсторфа в модификации П.В. Серебряникова. Легочную ткань извлекают из банки, ополаскивают дистиллированной водой, и из нее, преимущественно из подплевральных участков, ножницами вырезают 3-4 кусочка размерами по 10x5 мм каждый, которые помещают в фарфоровый тигель с перфорированным дном и, придерживая его рукой, располагают над небольшим стеклянным сосудом (химический стаканчик, бюкс). Кусочки измельчают ножницами непосредственно в тигле; придавливая массу шпателем к стенкам тигля, выдавливают легочный сок, ополаскивая массу время от времени дистиллированной водой. Собранная таким образом в сосуде под тиглем жидкость разливается в пробирки, а которых и центрифигируется указанным выше порядком. Образовавшийся при этом осадок подвергается микроскопическому исследованию.</p>
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол №2 от 05.12.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Имамбаева Н.Е. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории

ОГЛАВЛЕНИЕ**Методика исследования на наличие диатомового планктона при
диагностике утоплений**

1. Общие положения.....	6
2. Перечень использованных источников.....	12

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ДИАТОМОВОГО ПЛАНКТОНА В ДИАГНОСТИКЕ УТОПЛЕНИЙ

В практической деятельности судебно-медицинского эксперта нередко встречается необходимость исследовать труп, извлеченный из водоема. В таких случаях представителем органов следствия на разрешение экспертизы ставится вопрос о прижизненном или посмертном попадании в воду. Если обстоятельства дела известны и труп не подвергся гнилостным изменениям, то решение этого вопроса обычно не представляет затруднения. В других случаях, когда обстоятельства исчезновения человека неизвестны, а пребывание тела было длительным, решение этого основного вопроса без применения специальных исследований оказывается трудным, а подчас и невозможным. Научные исследования последних лет позволили углубить высказывания в этом направлении и применить метод обнаружения «планктона» во внутренних органах. К планктону относятся все взвешенные, плавающие в воде объекты: растительного и животного происхождения (фито и зоопланктон). При утоплении элементы планктона вместе с водой проникают в дыхательные пути, в легкие и далее через большой круг кровообращения во все внутренние органы. Все органические объекты, попадающие во внутренние органы утонувшего, подвергаются гниению, за исключением кремнеземных створок микроскопических диатомовых водорослей (диатомей).

Обнаружение диатомей во внутренних органах позволяет считать, что они попали вместе с током крови, при наличии деятельности сердца, т. е. прижизненно и могут считаться неопровержимым признаком утопления. Отсутствие диатомовых водорослей в органах брюшной или грудной полостей не дает основания для противоположного вывода, так как не исключает аспирации воды. Диатомовые водоросли могут не проникнуть во внутренние органы в тех случаях прижизненного попадания тела в жидкость, когда деятельность сердца прерывается в самом начале асфиксического процесса, или, когда наступила смерть в воде, без явлений последующего утопления, а также при отсутствии диатомей в воде глубоких колодцев, при быстром таянии снега, в лужах, образовавшихся от сильного дождя.

Вместе с тем, нахождение диатомей только в легочной ткани не может служить доказательством утопления, а является убедительным подтверждением пребывания трупа в воде, так как последняя проникает и в легкие трупа, погруженного в воду.

Характеристика диатомового планктона. Диатомовые водоросли широко распространены в природе и могут встречаться в самых различных водоемах, за исключением указанных выше, независимо от температуры воды в них; не находят в воде в любое время года, а также на земле и иногда в воздухе. Представители фитопланктона - диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) имеют столь малые размеры, что обнаруживаются только при помощи микроскопического исследования. Характерной их особенностью является двустворчатая оболочка (панцирь) с очень сложной структурой в виде

ребрышек точек, штрихов, иногда образующих пучки и т. п. Хроматофоры их желтые или светло-бурые, что зависит от присутствия в них, кроме хлорофилла, бурого пигмента диатомина. Если гнилостный процесс в трупе зашел уже далеко, то красящее вещество диатом отсутствует, но тем не менее хорошо виден их панцирь. Створки могут быть радиальными или двусторонне - симметричными.

Имеются структурные особенности и варианты концов створок диатомового планктона. Помимо двух порядков: *centrales*, расположение элементов структуры которых центрическое и *pennales* с перистым расположением структуры, имеется еще порядок *mediales*, занимающий промежуточное положение между ранее упомянутыми, структурами элементов которого расположена неправильно и редко в поперечных и продольных рядах. Для судебно-медицинских целей достаточно определить или установить семейство, а в отдельных случаях род, к которому относится тот или иной вид диатомовой водоросли.

Если систематизация диатомей для исследования затруднительна, то на первых порах можно ограничиться описанием их формы: ладьевидная, палочковидная, бочковидная, прямоугольная, веретенообразная, *s*-образная, в виде круга, в виде квадратов, соединенных в цепочки и др.

Отбор материала и направление его на исследование.

Так как результат лабораторного исследования внутренних органов из трупа на наличие в них диатомового планктона является убедительным и к тому же иногда единственным признаком утопления, то судебно-медицинский эксперт должен изъять и направить для такого специального исследования соответствующие органы и кровь.

Для исследования берутся: 1) невскрытая почка в капсуле с лигатурой, наложенной у ворот; 2) часть печени из краевого отдела весом 200-250г; 3) часть селезенки 70-80г (если она очень маленькая, то можно ее взять целиком без производства на ней разреза); 4) сердечная перегородка или часть сердечной мышцы (предпочтительно из левой половины сердца); 5) 100мл крови (при ее наличии); 6) одно легкое.

Консервирование объектов не производится. В отдельных случаях, при необходимости, возможно использование только дистиллированной воды. Для направления объектов применяются чистые стеклянные банки, ополоснутые дистиллированной водой; в каждую помещается один орган или часть его. Банки с изъятыми органами опечатываются и направляются в лабораторию. Сопроводительным документом к ним служит направление судебно-медицинского эксперта с указанием цели исследования и с приложением копии заключения судебно-медицинской экспертизы трупа. Наряду с направлением внутренних органов, в лабораторию судебно-медицинской экспертизы должен направляться в качестве образца 1 литр воды. Забор образца воды и направление его в лабораторию судебно-медицинской экспертизы осуществляются представителем органов следствия. Образец воды берется с поверхности водоема или с глубины 10-15см, т.к. все плавающие формы диатомовых водорослей находятся и в верхних слоях воды, откуда обычно вода

попадает в легкие тонущего человека. Донные формы диатомей редко попадают в организм утонувшего.

Забор образца воды проводится на месте утопления, если же оно неизвестно, то воду следует брать там, где был обнаружен труп. Вода набирается в стеклянную, хорошо вымытую посуду. Перед забором воды посуда дважды ополаскивается той же водой, которая берется в качестве образца, а затем заполняется до верха, закупоривается, опечатывается и на нсе, в соответствии с составленным протоколом, наклеивается этикетка с указанием времени и места взятия образца, кто делал забор воды и по какому делу.

Методика исследования.

Исследование воды и внутренних органов трупа на диатомовый планктон должен производиться, как правило, в судебно-гистологических отделениях судебно-медицинской лаборатории.

A. Исследование воды.

После описания полученных объектов приступают к исследованию образца воды. Для этой цели вода разливается в центрифужные пробирки (в соответствие с количеством гнезд центрифуги), в которых и центрифугируется (на ручной центрифуге 10-15 минут, на электрической, при 3 тысячах оборотов 2-3 минуты). Для концентрирования осадка можно применить «метод обогащения», заключающийся в том, что из каждой пробирки, после центрифугирования, пипеткой отсасывается около $\frac{3}{4}$ объема жидкости, наливается новая порция исследуемой воды и центрифугирование повторяется; так можно производить объединение всех порций осадков из присланного образца. Полученный суммарный осадок подвергают микроскопическому исследованию сначала при малом (80), а затем при большом (160 и более) увеличении. На предметное стекло наносятся на расстоянии не менее 1 см друг от друга 2-3 капли осадка, на которые накладываются покровные стекла. Для установления наличия диатомовых водорослей и ориентировочного определения семейства или рода следует просмотреть не менее 10—15 препаратов.

При микроскопировании необходимо следить за тем, чтобы покровные стекла плотно прилегали к предметным, во избежание перемещения исследуемого осадка, что позволит лучше рассмотреть обнаруженный экземпляр диатомеи. Если диатомовая водоросль хорошо видна со стороны створки, а для уточнения ее принадлежности к определенному виду и классу, ее необходимо осмотреть еще со стороны шва, то следует слегка надавить на предметное стекло концом пипетки или препаровальной иглы и, удерживая его в таком положении, дополнительно рассмотреть нужный объект. Исследование воды протоколируется записью в рабочем журнале. Если при исследовании указанного числа препаратов диатомовые водоросли не обнаруживаются, можно считать, что образец воды их не содержит.

Б. Исследование легочной ткани.

Исследование легочной ткани производится для выяснений наличия или отсутствия в ней диатомового планктона, сходства или различия его с

обнаруженным в образце воды и для получения данных с целью сопоставления их с планктоном, найденным в других внутренних органах. В основе исследования легочной ткани лежит метод Ревенсторфа в модификации Н.В. Серебряникова.

Легочную ткань извлекают из баки, ополаскивают дистиллированной водой, и из нее, преимущественно из подплевральных участков, ножницами вырезают 3-4 кусочка размерами по 10x5мм каждый, которые помещают в фарфоровый тигель с перфорированным дном и, придерживая его рукой, располагают над небольшим стеклянным сосудом (химический стаканчик, бюкс).

Кусочки измельчают ножницами непосредственно в тигле; придавливая массу шпателем к стенкам тигля, выдавливают легочный сок, ополаскивая массу время от времени дистиллированной водой. Собранная таким образом в сосуде под тиглем жидкость разливается в пробирки, в которых и центрифугируется' указанным выше порядком. Образовавшийся при этом осадок подвергается микроскопическому исследованию.

Диатомовые водоросли, обнаруженные в легочной ткани сравниваются с экземплярами, найденными в образце воды, по внешней форме, по семействам и родам. Весь ход исследования указывается в описательной части заключения эксперта; при этом указывается, сколько просмотрено препаратов и какое количество диатомей в них обнаружено (в препарате, в поле зрения). Попутно (для легочной ткани) могут быть указаны и другие составные части планктона: зеленые водоросли, представители зоопланктона, частицы силикатов и проч.

Состав диатомей в образцах воды и органах трупов чаще всего совпадает, но бывают и другие варианты, в особенности если взятие образца воды произведено спустя длительное время с момента исчезновения погибшего, когда, например, в легочной ткани имеются характерные для осеннего максимума диатомей, а в образце воды для весеннего; или в образце воды диатомей имеются, а в легочной ткани их не находят; это обстоятельство требует хотя бы предположительного решения вопроса, почему в легкие трупа, бывшего в воде, диатомей, а следовательно и вода не проникли.

При отсутствии выделения диатомовых водорослей в образце воды и в легочной ткани, трудно рассчитывать найти их во внутренних органах, хотя исследование для этой цели провести все же необходимо.

Если при исследовании легочного сока и образца воды обнаружится большое различие в составе диатомового планктона, например, в образце воды окажется наличие планкtonных микроорганизмов, характерных для водоема с проточной водой в данной местности, а в легочной ткани обычных для водоема зарытого типа (пруд, озеро), то возникает вопрос, не было ли мертвое тело первоначально (при жизни) в одном водоеме, а затем попало в другой, где было обнаружено. Такое соображение может быть подтверждено исследованием дополнительных образцов воды из тех водоемов, о которых идет речь. Если в легочной ткани, при исследовании по описанной выше методике, не находят диатомей или обнаруживают их в скучном количестве (из 15 препаратов только в 3-4), то легочную ткань необходимо подвергнуть минерализации

(разрушению органических веществ), которая позволила бы в остатке просмотреть объекты, оставшиеся не разрушенными. Обычно, после этого число обнаруживаемых диатомей значительно увеличивается.

В. Разрушение органических веществ.

Исследование других внутренних органов, а также дополнительно исследование легких, производится только после химического их разрушения в химико-токсилогическом отделении лаборатории; каждый орган разрушается отдельно.

100 граммов ткани исследуемого органа обмывают дистиллированной водой, измельчают, помещают в колбу Кельдаля, заливают 75мл смеси концентрированных серной и азотной кислот в соотношении 1:2 и осторожно нагревают на электрической плите или газовой горелке. Нагревание с периодическим введением в реакцию, по мере необходимости, концентрированной азотной кислоты по каплям производится до получения бесцветной прозрачной жидкости, не темнеющей при обильном выделении тяжелых белых паров окислов серы. Полученную жидкость охлаждают, осторожно нейтрализуют раствором аммиака и оставляют на сутки при комнатной температуре. Верхний слой жидкости сливают, а оставшуюся часть раствора центрифугируют. Отделенную при этом взвесь твердых частиц подвергают микроскопическому исследованию по описанному выше методу (см. исследование легочного сока). Скелетики диатомовых водорослей определяются по их резким очертаниям, симметричному строению и рисунку панциря.

Обнаружение диатомовых водорослей в образце воды и в легочной ткани указывает на те объекты, которые могут встретиться во внутренних органах. Применение кислот при минерализации внутренних органов, в особенности легочной ткани, иногда вызывает выпадение в осадки нерастворимых солей, зависящих от присутствия в легочной ткани значительного количества минеральных веществ. В тех случаях, когда эти осадки очень обильны, они почти полностью исключают возможность определения среди кристаллов, имеющихся в центрифугате, скелетиков диатомей.

Осадки часто состоят из множества правильных, шестиугольных, бесцветных табличек, по размерам своим равным или пре восходящим крупные диатомовые водоросли и представляют собой, по-видимому, сернокислые соединения кальция.

Для растворения этих солей можно применить гидротропный способ переведения в раствор плохо растворимых солей кальция. Для этого применяется насыщенный раствор трехзамещенного лимоннокислого аммония, который при комнатной температуре в течение 18-24 часов полностью или весьма значительно растворяет кристаллы, не вызывая заметных нарушений нежных кремневых скелетиков диатомовых водорослей. Воздействие реактива в течение 3-8 суток полностью

уничтожает и диатомеи. Однако встречаются осадки совершенно не поддающиеся растворению.

Кровь надлежит разрушать подобным же образом, но можно подвергать ее гемолизу, действуя на нее дистиллированной водой с добавлением небольшого количества эфира.

После тщательных поисков диатомей в остатках от разрушения внутренних органов (20-30 препаратов при условии обнаружения не менее 25-30 скелетиков диатомей), необходимо подробно их описать с указанием формы и особенностей. Одновременно с этим требуется произвести микрофотографирование обнаруженных диатомей, наиболее отчетливо видных в темном поле или применении фазово-контрастного устройства, для приобщения фотоотпечатков к заключению исследования вещественных доказательств. Если первичное разрушение внутренних органов не дало объективных результатов, химическое разрушение следует повторить с оставшимися частями органов.

Составление заключения.

Судебно-медицинское исследование внутренних органов трупов и образцов воды на диатомовый планктон оформляется заключением состоящим из трех частей введения, описательной части и выводов. Введение составляется так же как при документации исследования других вещественных доказательств. Описательная часть заключения состоит из обычных двух разделов: «Описание вещественных доказательств» и «Исследование». В разделе «Описание вещественных доказательств» указывается, когда и в какой упаковке (с подробным ее описанием) поступили объекты. Затем описывается каждый присланный на исследование орган (цвет, вес, состояние) и образцы воды (цвет, прозрачность, запах, примеси). В разделе «Исследование» дается подробное описание методики, техники и всего последовательного хода исследования и проводится установленные при этом данные с описанием найденных диатомей (форма, особенности структуры, наличие внутри диатомей пигмента и др). В выводах перечисляются органы, содержащие диатомовые водоросли, указывается количество обнаруженных диатом с подразделением их по признакам, приведенным выше. При известном навыке или при консультации ботаника обнаруженные диатомовые водоросли следует подразделять по семействам и даже по родам. К заключению должны быть приложены таблицы с микрофотограммами.

Оценка результатов исследования.

При оценке судебно-медицинским экспертом результатов лабораторного анализа органов, посланных им на исследование и образцов воды надлежит учитывать приведенные выше замечания об особенностях смерти человека в воде, когда асфиксический процесс прерывается остановкой сердечной деятельности или когда смерть протекает без проявления асфиксии.

Следовательно, отсутствие диатомовых водорослей во внутренних органах не может служить основанием к выводу эксперта об исключении в подобных случаях смерти от утопления.

При обнаружении диатомовых водорослей, различных по родам и семействам, в легочной ткани и во внутренних органах, эксперт должен учитывать возможную их разновременность попадания в организм. Это обстоятельство следует иметь также в виду при сравнении результатов исследования образца воды и внутренних органов.

Могут встретиться также случаи, когда образец воды, взятый на месте обнаружения трупа, будет значительно отличаться от состава диатомового планктона во внутренних органах, что может быть связано с возможностью смерти человека в другом водоеме.

Если при исследовании трупа будет установлено, что погибший при жизни болел силикозом, то это обстоятельство необходимо учитывать, так как обнаруживаемые в этих случаях диатомовые водоросли могли появиться в легких и других органах не в результате утопления, а самого заболевания, связанного с особенностями профессии.

Доказательное значение для диагностики утопления имеет обнаружение не менее 25-30 диатомовых водорослей во всех исследованных органах и крови.

На основании данных судебно-медицинского исследования трупа и лабораторных исследований внутренних органов этого же трупа и образца воды судебно-медицинский эксперт имеет основания, с учетом всего вышесказанного, прийти к научно-обоснованному выводу.

Перечень использованных источников:

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) - Астана, 2010.
2. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. - 1967.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Саркисова Д.С. и Перова Ю.Л.- М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).
4. Алтаева А.Ж. Альгологическая характеристика Капчагайского водохранилища и водопроводной воды г.Алматы //Суд.-мед. экспертиза в Казахстане.- 2003. - № 3. - С. 17.
5. Алтаева А.Ж., Жунисов С.С., Селивохина Н.В., Токтарова А.Б., Шаменов Р.К., Нургалиева Ж. Ж., Исмаилов Н.И. Опыт обнаружения диатомового планктона в судебно-медицинской экспертизе утопления. //Суд.-мед. экспертиза в Казахстане. - 2005. - № 1 - 2. - С. 37 - 38.
6. Алтаева А.Ж., Калиничева Т.П., Головина А.К., Медведева А.П. Перикардиальная жидкость как объект исследования при судебно-медицинской экспертизе утоплений //Суд.-мед. экспертиза в Казахстане. -2005. - № 4. - С. 15 - 17.
7. Алтаева А.Ж., Галицкий Ф.А., Айдаркулов А.Ш., Калиничева Т.П. Способ обнаружения диатомового планктона при судебно-медицинской экспертизе

- утоплений //Заключение о выдаче предварительного патента на изобретение (заявка № 2005/1137.1 от 28.09.2005) РГКП НИИС № 9136/02 от 24.04.2006.
8. Диатомовые водоросли России и сопредельных стран. Ископаемые и современные //СПб, 2002. – Т. 2. - Вып. 3. - 112 с.
9. Забелина М.М., Киселев И.А., Прошкина-Лавренко А.И., Шешукова В.С. Диатомовые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР // М., 1957. – Вып. 4.
10. Исаев Ю.С. Патотанатогенетические механизмы и судебно-медицинские критерии диагностики утопления в пресной воде. //дис. д.м.н. Восточно Сибирский филиал СО РАМН, 1992. - 323 с.