

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

“Қазақстан Республикасы Әділет Министірлігінің  
Сот сараптамалары орталығы”  
**БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ**  
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 1  
« 18 » маусым 20 20 ж. қаттамасы  
реттік нөмері № 25.1(2)

**МЕТОДИКА**

**УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ КРОВИ НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ  
ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

**(шифр специальности 25.1)**

## ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика установления наличия крови на вещественных доказательствах
2. Шифр специальности методики	25.1(2)
3. Информация о разработчике методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК, Зайнуллина Р.В. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по ЗКО ЦСЭ МЮ РК
4. Сущность методики	Методика основана на пероксидазных свойствах крови
4.1. Объекты исследования	Вещественные доказательства
4.2. Методы исследования	Макролюминесцентный, химический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	Установление наличия крови
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №1 от 18.06.2020г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Итбаева Ж.Ж. - СМЭ высшей квалификационной категории ИСЭ по г. Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Установление наличия крови с помощью УФЛ.....	4
Установление наличия крови пробой с перекисью водорода.....	4
Установление наличия крови реакцией с бензидином.....	4
Установление наличия крови реакцией хемотрюминесценции.....	5
Установление наличия крови с применением растворов тетрабазы и бария пероксида.....	5
Установление наличия крови микроспектральным методом (выявление гемохромогена).....	7
установление наличия крови микроспектральным методом (выявление гематопорфирина).....	8
Установление наличия крови методом тонкослойной хроматографии на силуфоловой пластинке.....	8
Установление наличия крови с помощью тест пластинок.....	9
Установления наличия крови с помощью тест-полосок .....	10
Перечень использованных источников .....	10

### **Установление наличия крови с помощью УФЛ**

Пятна крови в УФЛ имеют темно - коричневый цвет и бархатистый вид.

Если пятно крови под действием внешних воздействий изменилось до образования гематопорфирина, то в УФЛ оно имеет оранжево-красный цвет.

Исследование проводят в затемненной комнате с применением ртутно-кварцевой лампы (типа ОЛД - 41), подозрительные участки обшивают нитками и маркируют;

### **Установление наличия крови пробой с перекисью водорода**

Проба с перекисью водорода основана на способности каталазы крови разлагать перекись водорода на воду и атомарный кислород, который является сильным окислителем.

Техника проведения: на подозрительный участок пятна наносят 2-3 капли 3% раствора перекиси водорода и наблюдают за появлением пены, которая появляется на пятнах в присутствии крови.

Однако, появление пены возможно и при наличии в пятне гноя, грязи и других включений.

### **Установление наличия крови реакцией с бензидином**

Реакция на пероксидазные свойства крови основана на способности пероксидазы переносить кислород от одного вещества к другому. Для этого широко применяют реакцию с бензидином: на вату наносят смесь из 1% спиртового раствора бензидина и нескольких капель 3 - 5% раствора перекиси водорода и прикладывают к подозрительному пятну.

При положительной реакции на контактной части ваты появляется синее окрашивание, при отрицательной реакции вата остается бесцветной;

### **Установление наличия крови реакцией хемолюминесценции**

Реакция хемолюминесценции применима при плохом освещении места происшествия. Техника проведения: исследование проводится в темной комнате, где подозрительные участки опрыскивают из пульверизатора раствором люминола, который готовится следующим образом: в 1 литре дистиллированной воды растворяется 0,1 грамм люминола и 0,5 грамма натрия гидрокарбоната (сода) - все хорошо перемешивается. Перед опрыскиванием на 1 литр приготовленного люминола добавляют 10 мл пергидроля.

При положительном результате наблюдаются короткие вспышки голубого цвета продолжительностью до 65 секунд с образованием белой пены.

Такие участки очерчиваются и с них делаются соскобы, смывы, вырезки, которые используются для дальнейшего исследования в лаборатории.

### **Установление наличия крови с применением растворов тетрабазы и бария пероксида**

Принцип метода заключается в исследовании пероксидазных свойств гемоглобина путем обработки исследуемого пятна раствором пероксида бария в 10% уксусной кислоте. Первоначально исследуемые объекты обрабатывают реактивом тетрабазы, который со следами крови не вызывает синего



окрашивания, в то время как с некоторыми растительными пероксидазами и иными веществами может появиться синее окрашивание:

- ионы хлора (Cl) или соединения, содержащие хлор (ClO<sub>4</sub>, и др.);
- бактерии (микроорганизмы);
- банановая кожура, цитрусовые, дыня и др. - растительные пероксидазы

всех

видов, какие есть во фруктах;

- металлы, которые окисляются;
- катализаторы (стиральные порошки);
- формалин.

Для исключения неспецифического влияния вышеуказанных веществ, обладающих пероксидазной активностью, проводится предварительная обработка объектов раствором тетрабазы, взаимодействующей с ними и не взаимодействующей с кровью, чем и определяет специфичность метода.

Реакция очень чувствительна: если в ведре с водой есть только одна капля крови, то и при этом будет положительная реакция.

#### **Приготовление реактивов.**

При приготовлении реактивов очень важно, чтобы посуда была химически чистой (для ее мытья рекомендуется использовать раствор бихромата в серной кислоте).

Для приготовления **реагента тетрабазы** необходимо: 250 ml колба Эрленмейера; 25 ml колба Эрленмейера; 25 ml мерный цилиндр; 100 ml мерный цилиндр;

99,5% химически чистая ледяная уксусная кислота; тетрабазы (N, N, N, N - tetrametil - 4,4 - diamino-diphenil-methaan); 0,05 г. дистиллированная вода; магнитная мешалка; маленькая воронка; перчатки;

2 чистые бутылочки с пипетками (ёмкостью около 30 ml) - для хранения готовых реагентов.

#### **Приготовление:**

0,05 г тетрабазы всыпать в 25 ml колбу Эрленмейера. В мерный цилиндр влить 10 ml ледяной уксусной кислоты и вылить ее в колбу с тетрабазой, затем эту смесь поставить на магнитную мешалку (важно, чтобы мешалка **ОЧЕНЬ** медленно размешивала). Цвет раствора должен быть голубым, если синий цвет, то надо смотреть, что могло повлиять (нечистая посуда, плохое качество уксусной кислоты и проч.).

90 ml дистиллированной воды влить в 250 ml колбу Эрленмейера и сюда же очень медленно добавить содержимое маленькой колбы. Затем, эту смесь **очень** медленно размешать на магнитной мешалке примерно 30 минут.

Для приготовления **реагента пероксида бария** необходимо: 250 ml колба Эрленмейера; 100 ml мерный цилиндр; 25 ml мерный цилиндр;

99,5% химически чистая ледяная уксусная кислота; пероксид бария (BaO<sub>2</sub>-proanalysisi)^5rдистиллированная вода; магнитная мешалка; стеклянная палочка; перчатки;

чистая бутылочка для хранения готовых реагентов.

#### **Приготовление:**

0,05 г пероксида бария (**ядовит - не вдыхать!**) всыпать в 250 ml колбу Эрленмейера. В мерный цилиндр влить 90 ml дистиллированной воды и 10 ml ледяной уксусной кислоты. Затем эту смесь вылить в колбу с 5 g пероксида бария и поставить на магнитную мешалку (**ОЧЕНЬ** медленно) примерно на 30 минут.

Оба приготовленных реагента хранить в темной посуде в холодильнике. Срок хранения 1 месяц.

#### **Проведение исследования**

1. Ниточку из исследуемого пятна помещают поочередно на предметном стекле в одну каплю раствора тетрабазы, и после промокания фильтровальной бумагой, в одну каплю пероксида бария.

2. При необходимости можно использовать вырезки из пятна после проведения реакции хроматографии, при отрицательном результате последней.

3. При исследовании пятен, расположенных на предметах-носителях темного цвета (синего, черного, фиолетового и т.п.) вытяжку из пятна следует перенести на марлю.

4. При исследовании пятен, расположенных на не впитывающих поверхностях, смывы следует проводить, используя раствор тетрабазы.

#### **Учёт результатов.**

1. Реакция считается положительной при появлении синего окрашивания только с пероксидом бария.

2. Реакция считается отрицательной при отсутствии синего окрашивания с пероксидом бария.

3. При появлении синего окрашивания с раствором тетрабазы реакция считается неспецифичной и требует применения других методов установления наличия крови.

#### **Установление наличия крови микроспектральным методом (выявление гемохромогена)**

Метод основан на способности гемоглобина и его производных, поглощать световые волны определенной длины, образуя темные полосы поглощения. Каждое производное гемоглобина характеризуется различным количеством полос поглощения, шириной, интенсивностью и их локализацией. Для каждого деривата гемоглобина спектр полос поглощения постоянен, меняется лишь интенсивность полос, зависящая от концентрации крови.

Спектры метгемоглобина и гематина обладают низкой чувствительностью, полосы поглощения слабо выражены, что может привести к ошибке. Поэтому гемоглобин крови в пятне искусственно переводят в гемохромогенигематопорфирин, которые обладают высокой спектральной чувствительностью и дают четкие полосы поглощения.

Кровь в пятнах под воздействием внешних факторов видоизменяется и гемоглобин постепенно переходит в метгемоглобин, гематин и гематопорфирин.

#### **Техника исследования**



Необходимые аппаратура и реагенты: спектральная насадка АУ-16 или СПО-1, реактив Капелиович, который готовится следующим образом -1 грамм осажденной серы (или элементарной) помещается в пробирку, заливается 10 мл 20% раствора NaOH, нагревается на спиртовке до растворения серы, остужается и к раствору серы добавляется 10 мл этилового спирта. Реактив вновь нагревается на слабом огне до появления темно - янтарного цвета. Готовый реактив проверяется на заведомом образце крови, при положительном результате контроля реактив используется для исследования пятен. Срок хранения реактива Капелиовича до 2 месяцев в темных склянках-при комнатной температуре. Соскобы или ниточки из пятна помещаются на предметное стекло, разволокняются и к ним добавляется 2-3 капли реактива Капелиович. Объекта помещаются на предметный столик микроскопа и исследуются с помощью микроспектральной насадки АУ-16. Под действием щелочи гемоглобин переходит в гематин, последний под влиянием восстановителя переходит в гемохромоген. В препарате с кровью видны аморфные глыбки вишнево-красного, розового, желтовато-розового цвета, что зависит от количества гемоглобина в пятне. Выбирается изолированная глыбка (чтобы не было нитей ткани) и микроскопируется. При наличии гемохромогена видны две полосы поглощения в желто-зелёной части спектра между фраунгоферовыми линиями Д и Е, длиной волны 565 - 520. Левая полоса поглощения более широкая, интенсивная, четкая, а правая более слабая, расплывчатая, не всегда заметная. В хорошо замытых пятнах крови можно получить отрицательный результат, в таких случаях можно ниточку не расщеплять, рекомендуется даже наслаивать друг на друга 2-3 кусочка из . пятна, усилив при этом освещение при микроскопическом исследовании. Такая процедура может привести к получению положительного результата.

Гемохромогеновую пробу можно видоизменить, заменив восстановитель подогреванием препарата. Для этого, к кусочку (соскобу) пятна на предметном стекле добавляется 2-3 капли 30% раствора едкой щелочи (NaOH) и нагревается до начала кипения. В результате исследования с помощью микроспектральной насадки в препарате можно различить гемохромоген в виде шаров красно - бурого цвета в центральной части, и желтоватого цвета по краям шара. Также в препарате можно различить мелкие шары желтого цвета.

Отрицательный результат данной реакции может быть в двух случаях: во-первых - когда кровь отсутствует; во-вторых - когда гемоглобин перешел в стадию гематопорфирина.

#### **Установление наличия крови микроспектральным методом (выявление гематопорфирина)**

Для открытия гематопорфирина существует специальная проба с концентрированной серной кислотой: кусочек ткани (соскоб) из пятна помещается на предметное стекло и обрабатывается 2-3 каплями концентрированной серной кислоты, которая растворяет кровь с большим сроком давности. При микроскопическом исследовании в положительных

случаях видны участки бледно - сиреневато-красноватого или желтовато - зеленоватого цвета. Такие участки исследуют с помощью микроспектральной насадки. Спектр гематопорфирина проявляется в виде двух полос поглощения: первая полоса расположена в оранжевой части спектра (слева), а вторая полоса расположена в желто - зеленой части спектра (справа), длина волн соответственно 605 - 590 и 565 - 540. Чувствительность гематопорфириновой пробы ниже гемохромогеновой пробы.

#### **Установление наличия кровиметодом тонкослойной хроматографии на силуфоловой пластинке**

Тонкослойная хроматография может быть восходящей (вертикальной) и горизонтальной.

В тех случаях, когда испытуемый след имеет столь малую величину, что использование материала для микроспектрального анализа может нарушить возможность получения дальнейшей необходимой информации об обнаруженной крови (видовая, групповая принадлежность и т.д.) рационально прибегнуть вместо микроспектрального анализа к методу хроматографии.

Кроме того, необходимо иметь в виду, что метод предпочтителен для микрообъектов и последующим причинам.

Во-первых, при исследовании одной и той же вытяжки из следа можно получить возможно полную о нем информацию.

Во-вторых, в той же вытяжке можно определить примесь к крови некоторых выделений, чрезвычайно большое значение для определения групповой принадлежности крови.

В-третьих, здесь устраняется основной недостаток контрольных опытов. Обычно исследуют контрольные участки материалов вещественных доказательств из области, расположенной возле испытуемых следов. Это является лишь относительным контролем, так как не дает уверенности; в равноценности загрязнений участков.

При хроматографическом анализе достигается подлинное контролирование предметов-носителей.

Для установления крови в следах пользуются распределительной хроматографией.

Распределительная хроматография была применена для доказательства кровяного происхождения следов на основании обнаружения наличия гемоглобина, образующего на хроматограмме специфичную зону. Выявление этой зоны базируется на пероксидазных свойствах гемоглобина, который аналогично ферментам группы пероксидаз обладает способностью катализировать окислительно-восстановительные реакции.

В связи с этим для обнаружения зоны гемоглобина на хроматограммах применяют соответствующие реагенты - проявители, например, растворы бензидина, фенолфталеина, 0-толидина и др. в сочетании с перекисью водорода. Гемоглобин разлагает перекись водорода с выделением атомарного кислорода, который окисляет бензидин и пр., что сопровождается изменением окраски первых реагентов.



*При исследовании используются:*

- система растворителей: н - бутанол - уксусная кислота-вода (4:1:2);
- детектирующий реагент: 10%-ный раствор бензидина в этаноле с уксусной или соляной кислотой (10:1) и 3%-ный раствор перекиси водорода;
- свидетель: 0,01%-ный раствор крови в физиологическом растворе.

1. *Подготовка исследуемого материала.* Кусочек из следа или весь микрообъект экстрагируют физиологическим раствором, взятым в небольшом избытке, при 4-8°C; продолжительность экстракции зависит от степени растворимости испытуемого следа (от нескольких минут до нескольких суток): затем препарат центрифугируют (если это необходимо) и разводят небольшую часть его физиологическим раствором до бледно-желтого или желтовато-розового цвета.

Получение бесцветного экстракта не препятствует его хроматографированию.

2. *Нанесение подготовленного материала на сорбент.* На линию старта в 5-7 мм от левого края пластинки на сорбент, легко касаясь поверхности, чтобы его не повредить, наносят капилляром с ровным концом каплю вытяжки из испытуемого следа и подсушивают ее при комнатной температуре или в потоке нагретого воздуха (фен, вентилятор).

На образовавшееся пятно помещают вторую каплю, подсушивают до расходования вытяжки объемом 1-2 мкл.

Таким же образом на пластинку наносят свидетель. На одну пластинку могут быть помещены вытяжки из ряда следов: расстояние между ними, включая и свидетель, должно быть не менее 5 мм.

Пластинку с подсушенными на ней вытяжками помещают на 15 минут в сушильный шкаф при 100 для инактивации возможно имеющейся в вытяжках пероксидазы растительного происхождения.

3. *Разделение - собственно хроматографирование.* В чашку Петри наливают растворитель, высота слоя которого не должна превышать 1 мм. На дно чашки помещают подставку (кусочек пластинки Силуфол Г-образной формы или кусочек стекла) высотой равную фитилю.

Пластинку в строго горизонтальном положении кладут на подставку так, чтобы нижний край фитиля достиг дна чашки. Чашку накрывают крышкой. Разделение ведут до достижения растворителем линии фронта, на что требуется обычно 7-10 мин.

4. *Детектирование.* Пластинку вынимают из камеры и высушивают при 60°C в течение 5-10 мин., либо при комнатной температуре до устранения запаха уксусной кислоты.

Детектирование зоны гемоглобина осуществляют при помощи бензидиновой реакции. Следует отметить, что бензидиновая реакция, применяемая в качестве предварительной с целью обнаружения следов крови, считается неспецифичной, так как положительный ее результат дает не только животная, но и растительная пероксидаза, а изменение окраски бензидина может происходить при взаимодействии с различными окислителями, солями тяжелых металлов и пр.

При хроматографическом анализе этот недостаток бензидиновой реакции снимается. Зона растительной пероксидазы совпадает с зоной гемоглобина по цвету и  $R_f$ , но это пероксидаза мало устойчива к температурному воздействию и инактивируется при нагревании пластинки в течение 15 мин. При 100°C (до операции разделения).

Различные окислители либо остаются на линии старта либо, дают окрашенные зоны до прибавления перекиси водорода. При этом значения  $R_f$  упомянутых зон значительно отличаются от зоны гемоглобина; то же относится к окраске зон, которая имеет различный, но не синий цвет.

*Технически детектирование осуществляется следующим образом.*

Поскольку зона гемоглобина располагается в верхней трети пластинки, эту часть последней опрыскивают при помощи пульверизатора раствором бензидина. Спустя 3-5 мин. Производят опрыскивание той же части пластинки раствором перекиси водорода.

5. *Учет результатов.* Хроматограмму рассматривают невооруженным глазом. Образование на ней зоны синего цвета различной интенсивности недалеко от линии фронта указывает на наличие гемоглобина. Что касается значения  $R_f$ , то оно варьирует в зависимости от ряда факторов: примененного сорбента, состава растворителя, концентрации вытяжки из испытуемого следа, температуры окружающей среды и других технических причин.

Наличие гемоглобина доказывают путем сопоставления образовавшегося на хроматограмме зоны с зоной свидетеля.

Наличие в образце выделений человеческого организма не мешает выделению крови этим методом

#### **Установление наличия крови с помощью тест пластинок**

Реакция основана на содержании гликофорина А либо гемоглобина в крови человека, который взаимодействует на тест-пластинке с моноклональными антителами мыши с образованием комплекса антиген-антитело, мигрирующего с током жидкости до тестовой линии

##### **Постановка реакции:**

1. Вырезки из объектов для экспертизы (площадью около 20мм) инкубируют в 100мкл универсального буфера в течение 1-2 часов при комнатной температуре.
2. Отобрать 10мкл полученного экстракта и смешать с 90мкл универсального буфера
3. Полученный объем-100мкл вносят в углубление теста.
4. Оценка результата в течение 10минут

##### **Учет результатов**

Учет результатов визуальный. Наличие двух красных полос в контрольной (С) и тестовой зоне (Т) свидетельствует о положительном результате-наличии крови человека, появление только одной видимой красной полосы в контрольной зоне (С) свидетельствует об отрицательном результате.



### **Установление наличия крови с помощью тест-полосок**

Реакция основана на способности тетраметилбензидина образовывать при окислении пероксидом водорода в присутствии пероксидазы гемоглобина интенсивно окрашенное соединение. Таким образом, гемоглобин присутствующей в пробе крови катализирует окисление индикатора органическим гидропероксидом.

#### **Постановка реакции:**

Кусочки из пятен, предметов-носителей заливаются физиологическим раствором на 20-48 часов, экстрагирование проводится в условиях комнатного холодильника.

Вытяжки по 1 капле из каждого объекта исследования наносятся на соответствующий индикатор

результат учитывается в течение 60 секунд

#### **Учет результатов**

Учет результатов визуальный. При положительном результате на крайней индикаторной зоне полоски отмечается окрашивание от голубого до интенсивно синего цвета. При отрицательном результате цвет не изменяется.

#### **Список использованной литературы:**

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. Методика установления наличия крови с помощью тест-кассеты «HEMDIRECT» – Астана, 2016г.
5. Инструкция по применению тест полосок «RSIDBLOOD»
6. Методическое пособие по установлению наличия крови//Центр судебной медицины МЗ РК. – Астана,2004
7. <http://moitabletki.ru/test-poloski-krov-mochi.html>