

**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 № <u>1</u>	
« <u>18</u> » <u>маусым</u> <u>2020</u> ж.	хаттамасы
реттік номері №	<u>25.1(8)</u>

МЕТОДИКА

**УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ КАЛА НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ
ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

(шифр специальности – 25.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика установления наличия кала на вещественных доказательствах
2. Шифр специальности методики	25.1(8)
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	Извлечение из пятен элементов кала с последующим их микроскопическим исследованием
4.1. Объекты исследования	Вещественные доказательства
4.2. Методы исследования	Цитологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	Вырезки экстрагируют дистиллированной водой с небольшим избытком в течение 18 часов в условиях комнатного холодильника. Вытяжки центрифугируют, осадки исследуют под микроскопом на предметных стеклах. Вырезки из объектов на предметных стеклах разволокняют и готовят 3 препарата: с дистиллированной водой; с раствором Люголя и раствором Судана III. При микроскопическом исследовании обнаруживают: в нативном препарате – детрит, остатки мышечных волокон и клетчатки; с раствором Люголя – синеватые и фиолетовые зерна крахмала разной величины; с Суданом III – оранжевые глыбки нейтрального жира
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №1 от 18.06.2020г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК

ОГЛАВЛЕНИЕ

МЕТОДИКИ УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ КАЛА

Установление наличия кала в нативных препаратах

Техника постановки реакции.....4

Учет результатов.....4

Установление наличия кала методом электрофореза в агаровом геле

Введение.....4

Техника постановки реакции.....5

Энзимография..... 6

Перечень использованных источников.....6

МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ КАЛА

Установление наличия кала в нативных препаратах:

Техника постановки реакции

Вырезки экстрагируют дистиллированной водой с небольшим избытком в течение 18 часов в условиях комнатного холодильника. Вытяжки центрифугируют, осадки исследуют под микроскопом на предметных стеклах. В положительных препаратах обнаруживаются растительная клетчатка, желчные пигменты, микрофлора, зерна крахмала, мышечные волокна I,II,III порядка и др.

Вырезки из объектов на предметных стеклах разволокняют и готовят 3 препарата: с дистиллированной водой; с раствором Люголя и раствором Судана III.

Учет результатов

При микроскопическом исследовании обнаруживают: в нативном препарате – детрит, остатки мышечных волокон и клетчатки; с раствором Люголя – синеватые и фиолетовые зерна крахмала разной величины; с Суданом III – оранжевые глыбки нейтрального жира.

Установление наличия кала методом электрофореза в агаровом геле

Введение

Метод электрофореза в агаровом геле с последующей энзимографией на фосфатазные свойства при щелочном pH субстратной смеси может быть использован для установления наличия кала в пятнах по щелочной фосфатазе.

Щелочные фосфатазы (ЩФ) – группа неспецифических ферментов, катализирующих гидролиз фосфорных эфиров с образованием неорганического фосфата. ЩФ широко распространены в природе, они обнаружены в некоторых тканях организма человека, высших животных, грибах, бактериях. Оптимум действия ЩФ находится при pH около 9,0.

Электрофоретический метод установления наличия кала сходен с электрофоретическим методом установления наличия спермы по кислой фосфатазе, за исключением величины pH среды, в которой проходит ферментативная реакция на фосфатазные свойства объектов. Поэтому основные параметры обоих методов совпадают за исключением следующих: 1) ферментативная реакция проводится без этапа подкисления лимонной кислотой субстратной смеси, содержащей фенолфталейнфосфат натрия, при pH 9,0; 2) незначительного увеличения концентрации фенолфталейнфосфата натрия (применяется 0,34% его раствор вместо 0,32%); 3) но проводится заключительная обработка электрофореграмм щелочью для проявления фосфатазных свойств, поскольку они проявляются в процессе инкубации. При этом на электрофореграмме ЩФ выявляется только в кале при невыявлении ее в крови и других выделениях организма человека (влагалищных выделениях, слюне, моче, поте, выделениях из носа, женском молоке), а также в объектах растительного происхождения.

За положительный результат реакции принимается выявление зоны активности ЩФ малинового цвета, находящейся на электрофореграмме в

пределах зоны миграции пигментов крови человека (от гемоглобина до метгемальбумина) и занимающей либо всю эту площадь, либо ее часть.

При использовании агаровых гелей с относительно малой величиной электроэндоосмоса, в которых гемоглобин человека мигрирует от старта в сторону анода, зона активности ЩФ располагается только в анодной части электрофореграмм; при использовании агаровых гелей с относительно большой величиной электроэндоосмоса, в которых гемоглобин человека мигрирует к катоду, зона активности ЩФ располагается либо в катодной, либо в анодной части электрофореграммы, либо в обеих частях одновременно, находясь во всех случаях в пределах миграции пигментов крови человека.

Электрофоретический метод установления наличия кала позволяет выявлять ЩФ в пятнах, по экспериментальным данным , в 92%о образцов. Принципиально возможно выявление ЩФ в пятнах кала давностью до 7 лет /срок наблюдения /, хотя возможность выявления ЩФ в пятнах с увеличением срока хранения снижается. Необходимо также отметить, что возможно выявления ЩФ в различных участках пятна кала неодинакова, поэтому невыявление ЩФ не является доказательством отсутствия кала в пятне и указывает на целесообразность исследования нескольких участков одного того же пятна.

Доказательное значение электрофоретического метода установления наличия кала имеют только положительные результаты, а при отрицательных результатах исследование должно быть продолжено цитологическим методом. По сравнению с другими методами исследования ЩФ, данный метод не требует применения красителей зарубежного производства.

Техника постановки реакции

Электрофоретическое разделение образцов проводят в 1%агаровом геле. Принципиально пригодны все сорта агара, образующие гели в концентрации 1%. Для приготовления агарового геля и проведения электрофореза может быть использован один из 2вариантов буферных растворов. Оба варианта равноценны по своему применению. Выбор буферного раствора определяется наличием реактивов в лаборатории .

1 вариант буферного раствора – мединалвероналовыйбуфер слактатом кальция рН 8,6. Состав переходного буфера: Барбитал – натрия (мединал) – 8,76г,барбитал(веронал) – 1,38г, лактат кальция – 0,38г, дистиллированная вода – до 1л. Состав исходногогелевого буфера: Барбитал – натрия (мединал) – 10,51г,барбитал (веронал) – 1,66г, лактат кальция – 1,536г,дистиллированная вода – до 1л.

Для приготовления 1%агарового геля берут на каждые 4 части дистиллированной воды -2 части исходного гелевого буфера и соответствующее количество агара (например, на 400мл дистиллированной воды – 200мл исходного гелевого буфера 6г агара), т.е. также, как и для проведения реакции встречного иммуноэлектрофореза.

2 вариант буферного раствора - мединаловыйрН 8,2.-Состав гелевого и переходного буфера одинаков: Барбитал- натрий (мединал) -17,0г,1-н соляная кислота – 23,0мл, дистиллированная вода-до 2л. Буферные растворы могут длительно храниться в банках из темного стекла с притертыми пробками.

Пользоваться электродными буферными растворами можно неоднократно до изменения рН раствора. Перед каждым опытом рН проверяют.

Состав субстратного буфера и субстратной смеси. Субстратный буфер: Натрий лимоннокислый трехзамещенный – 13,19г, кислота лимонная – 1,08г, дистиллированная вода до 1л. Субстратная смесь. (готовится непосредственно перед употреблением). К 200мл субстратного буфера, указанного выше, прибавляют 6,8мл 10% водного раствора фенолфталенфосфата натрия / либо 680мг фенолфталейнфосфата натрия в порошкообразном состоянии /, при этом рН субстратной смеси составляет 9,0. 200мл субстратной смеси достаточно для инкубации агарового блока размерами 13х18см в фотокувете размерами 18х23см. Внесение исследуемых образцов в гель и проведение электрофореза.

Вырезки из подозрительных на кал участков (2-5 ниточек длиной 0,5-0,7см, весом 1-2мг) непосредственно вносят в лунки агарового геля, где их увлажняют изотоническим раствором хлорида натрия до полного заполнения лунок. Непосредственное внесение исследуемого материала в гель способствует лучшему выявлению ЩФ. Лунки делают пробойником диаметром 0,2см, располагают их в вертикальных рядах. На стеклянных пластинах размерами 13х18см располагается два вертикальных ряда, расстояние между ними 5-5,5см. В одном вертикальном ряду располагается до 30 лунок, расстояние между ними 2-3см. Для контроля в каждом ряду электрофоретически разделяют заведомо известное пятно кала (положительный контроль) и пятно крови (отрицательный контроль). Обработка контрольных пятен изотоническим раствором хлорида натрия такая же, как и исследуемых пятен. Контакт гелевого блока с переходным буфером осуществляется двумя листками фильтровальной бумаги. Длительность электрофореза 2-2,5 часа при силе тока 60-80мА и напряжении 160-200В.

Энзимография

По окончании электрофореза исследуемые нити извлекаются из блока агарового геля. Стеклопластинка с субстратной смесью рН 9,9 для инкубации. Инкубация проводится в термостате в течение 2 часов при температуре +37⁰С. Полосы ферментативной активности ЩФ проявляются в процессе инкубации, поэтому по окончании последней, пластинка извлекается из субстратной смеси и результаты реакции регистрируются.

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. Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР №387\дт 14 июня 1991г. Установление наличия кала методом электрофореза в агаровом геле.-М., 1991.-5с.