

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



МЕТОДИКА

УСТАНОВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ НА
ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ

(шифр специальности – 25.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика установления видовой принадлежности крови на вещественных доказательствах
2. Шифр специальности методики	25.1(9)
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	При взаимодействии вытяжки из объекта с преципитирующей сывороткой образуется кольцо либо полоса преципитата
4.1. Объекты исследования	Вытяжки из пятен крови
4.2. Методы исследования	Хроматографический, иммунологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	При взаимодействии антигена и исследуемой вытяжки при положительном результате образуется либо кольцо, либо окрашивание
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

МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Установление видовой принадлежности крови методом хроматографии	
Техника постановки реакции.....	4
Учет результатов.....	4
Установление наличия белка пробой Геллера	
Техника постановки реакции.....	4
Учет результатов.....	4
Установление видовой принадлежности крови по Чернову	
Техника постановки реакции.....	4
Учет результатов.....	5
Установления видовой принадлежности крови морфологической пробой	
Введение.....	5
Техника постановки реакции.....	5
Учет результатов.....	5
Установление видовой принадлежности крови (выделений, клеток эпителия) реакцией кольцепреципитации Чистовича - Уленгута	
Введение.....	5
Техника постановки реакции.....	6
Результаты реакции.....	6
Оценка результатов реакции преципитации и тактика эксперта.....	6
Установление видовой принадлежности крови реакцией преципитации в агаре	
Введение.....	7
Техника постановки реакции.....	7
Учет результатов.....	8
Установление видовой принадлежности крови реакцией встречного иммуноэлектрофореза	
Введение.....	8
Техника проведения встречного иммуноэлектрофореза.....	9
Перечень использованных источников.....	10

МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Установление видовой принадлежности крови методом хроматографии Техника постановки реакции

На стартовую линию хроматографической бумаги, отступя 1,5 - 2 см от края очерчивают кружочки диаметром 1 - 1,5 см. В центральную часть каждого кружочка вносится преципитирующая сыворотка и бумага высушивается при комнатной температуре. Затем в центр каждого кружочка вводится антиген и исследуемые вытяжки так, чтобы диаметр пятен не превышал 0,4 - 0,5 см. После нанесения антигена хроматографическая бумага без предварительного высыхания помещается во влажную камеру на 30 минут. После чего бумага свертывается в виде трубочки и помещается в ёмкость с изотоническим раствором хлорида натрия с таким расчётом, чтобы стартовая линия находилась на 1 см выше уровня раствора. Разгонка продолжается в течение 12 - 15 минут, в течение которых растворитель поднимается на расстояние 6 - 7 см от линии старта. Бумага извлекается, высушивается в течение 5 минут при T+100°C и окрашивается бромфеноловым синим 10 минут. Приготовление бромфенолового синего: бромфенолового синего - 5 г, этанола 96° - 100 мл, ледяной уксусной кислоты - 2 мл. После промывания хроматографической бумаги проточной водой в течение 2 - 5 минут.

Учет результатов реакции

При положительном результате в центре круга на общем голубом фоне отмечается кольцо ярко синего цвета, при отрицательном результате будет наблюдаться голубой фон без кольца.

Установление наличия белка пробой Геллера

Техника постановки

На часовое стекло наносится небольшое количество концентрированной азотной кислоты. В капилляр набирают небольшое количество вытяжки, затем конец капилляра помещается в азотную кислоту по углом 45 градусов

Учет результатов

На границе вытяжки и кислоты должно образоваться легкое белесоватое облачко, соответствующее содержанию белка 1:1000.

Вытяжки испытывали концентрированной азотной кислотой на наличие белка в концентрации 1 : 1000. Наблюдают зону помутнения на границе соприкосновения вытяжки и кислоты.

Установление видовой принадлежности крови по Чернову

Техника проведения реакции

В пробирку микродозатором помещается 0,03 мл преципитирующей сыворотки и 0,3 мл вытяжки (можно к 1 капле сыворотки добавить 9 капель вытяжки, лучше микродозатором), пробирки встряхиваются, помещаются в термостат на 1 час при T+37°C, после чего жидкость переносится в градуированные пипетки, которые устанавливаются в горизонтальном положении так, чтобы один конец пипетки соприкасался с хроматографической бумагой. После того, как всё содержимое пипетки перейдёт на бумагу, последняя окрашивается 10 - 15 минут бромфеноловым синим (0,1 гр.

бромфенолового синего на 500 мл этилового спирта + 5 мл ледяной уксусной кислоты) и промывается 5 минут проточной водой.

Учет результатов

При положительном результате в центре появляется кружок синего цвета. При отрицательном результате вся бумага имеет однородное голубоватое окрашивание. Реакция высоко специфична, более чувствительна, чем реакция кольцепреципитации.

Установление видовой принадлежности крови морфологической пробой

Введение

Эта проба применяется в тех случаях, когда со всем набором преципитирующих сывороток наблюдается отрицательный результат реакции при достаточном количестве белка (1: 1000), что может наблюдаться при наличии в объектах исследования крови рыб или немлекопитающих особей, например, птиц. Данная реакция является ориентировочной, так как не решает конкретного вопроса о видовой принадлежности крови. Метод основан на различии строения форменных элементов крови - эритроцитов. Эритроциты млекопитающих животных и человека не содержат ядер, в эритроцитах же крови рептилий, земноводных, рыб, птиц имеются ядра.

Техника исследования

Корочки сухой крови или кусочки из пятен помещаются на предметное стекло и обрабатываются 5% раствором уксусной кислоты, объекты слегка разволокняются. Исследование проводится с помощью светового микроскопа. При этом кровь рыб, птиц и т. п. будет иметь следующий вид: среди бесструктурной сероватой массы обнаруживаются блестящие тельца овальной и округлой формы, внутри которых отмечаются округлые или овальные ядра.

Учет результатов

В препаратах с кровью млекопитающих наблюдается бесструктурная масса серого цвета, среди которой можно различить лейкоциты, ядер в эритроцитах не бывает.

Установление видовой принадлежности крови (выделений, клеток эпителия) реакцией кольцепреципитации Чистовича–Уленгута

Введение

В реакцию вводятся не менее трёх видоспецифических сывороток - на белок человека и двух любых животных (желательно по большему распространению тех видов животных, которые имеются в данном регионе).

Техника постановки реакции

В конические пробирки с соответствующей маркировкой вносится небольшое количество (две капли) вытяжек из пятен, предметов - носителей, физиологический раствор, причём каждая вытяжка из пятен переносится в пробирки отдельной пипеткой, и подслаивается соответствующая преципитирующая сыворотка в соотношении к вытяжке 1: 10. Во время первого подслоения преципитирующей сыворотки включается секундомер и отмечается время появления колец преципитации, данные реакции записываются в рабочем журнале по утверждённой таблице № 3. За реакцией наблюдают в течение 1 часа.

Таблица № 3
Результаты реакции:

№№ объектов	Преципитирующие сыворотки	Проба с H NO ₃	на белок человека с..... от.....	на белок лошади с..... от.....	на белок птицы с..... от.....
			с..... от.....	с..... от.....	с..... от.....
1 к	-		- 1 час	- 1 час	- 1 час
1	+		+ 2'	- 1 час	- 1 час
2	+		+ 2'	- 1 час	- 1 час
3	-		+ 10'	- 1 час	- 1 час
5к	-		- 1 час	- 1 час	- 1 час
5	+		+ 5'	- 1 час	- 1 час
Физ р-р	-		- 1 час	- 1 час	- 1 час
Антиген	+		+ 2'	+ 2'	+ 2'

Оценка результатов реакции преципитации и тактика эксперта

1. Результат реакции с вытяжками из предметов - носителей и со всеми преципитирующими сыворотками, введёнными в реакцию, должен быть отрицательным. С вытяжкой из пятна крови одного вида должен быть получен положительный результат в виде кольца преципитации белого цвета на границе соприкосновения вытяжки и одной преципитирующей сывороткой из трёх преципитирующих сывороток, введённых в реакцию. Такой результат свидетельствует о том, что в данном пятне обнаружена кровь одного вида.

2. Если осадок преципитации выпадает с двумя сыворотками, то нужно данный результат проверить с другими сериями этих же сывороток, или в реакцию ввести полный набор преципитирующих сывороток, имеющихся в лаборатории. При получении таких же результатов делается вывод о том, что в данном пятне кровь принадлежит двум видам, то есть, наблюдается смешение крови двух видов.

3. Если с пятном крови получен отрицательный результат с тремя преципитирующими сыворотками, то эту реакцию нужно проделать со всем набором преципитирующих сывороток. В случае, когда с одной из этих сывороток получен положительный результат, делается вывод о присутствии крови этого вида животного. Отрицательный результат со всеми сыворотками может наблюдаться, как при малом количестве видоспецифического белка, так и при отсутствии среди стандартных преципитирующих сывороток той сыворотки, кровь которого животного имеется в данном пятне. Например, в пятне находится кровь суслика, а среди преципитирующих сывороток отсутствует таковая, поэтому и результат будет отрицательный со всем набором сывороток, имеющихся в лаборатории.

При малом количестве белка, проба Геллера отрицательная, реакцию преципитации ставить нужно, так как разрешающая способность стандартных сывороток в 5 - 10 раз больше, чем количество белка в вытяжке, равное 1 : 1000. При отрицательном результате реакции в таком случае нужно применить более чувствительные методы: реакции электропреципитации, иммунофлюоресценции и другие.

Установление видовой принадлежности крови реакцией преципитации в агаре

Введение

Эта реакция применяется в тех случаях, когда вытяжки не удаётся очистить от мутности, опалесценции и при неспецифическом выпадении осадков. Метод предложен О. Ouchterloni в 1949 году, реакция может быть проведена на предметных стёклах, на стеклянных пластинках, в чашках Петри. Метод менее чувствителен, чем вышеуказанные методы.

Необходимые реагенты, посуда: агар, преципитирующие сыворотки, антигены, чашки Петри, дистиллированная вода, физиологический раствор, пробойник, препаровальные иглы.

Техника постановки реакции

Готовится 1% агар - для этого 1 грамм агара расплавляется на водяной бане в 100 мл дистиллированной воды. После добавления воды к агару на колбе ставится метка уровня воды. О полном растворении агара свидетельствует гомогенность раствора, хлопьев не должно быть. Такой раствор в горячем виде профильтровывается через ватно-марлевый фильтр и выливается в ёмкость толщиной слоя 2 - 3 см.

Агар должен застыть, затем его разрезают на кусочки, помещают в колбу, верх которой обвязывают двухслойной марлей, и колбу ставят под проточную воду на 2 - 3 суток для отмывания примесей в агаре. По истечению срока вода из колбы выливается, а в колбу до метки доливается физиологический раствор, агар вновь расплавляется на водяной бане. Данная процедура проводится с неочищенным агарам.

Если используют очищенный агар фирмы "ДИФКО", "ФЕРАК", то берется один грамм агара, который расплавляется в 100 мл дистиллированной воды на водяной бане, отметив на ёмкости уровень жидкости до расплавления агара.

Когда агар уплотнится, то до этой метки доливается физиологический раствор хлористого натрия. Агар вновь расплавляется, закрывается ватно-марлевой пробкой и хранится в холодильнике до 6 месяцев.

Расплавленный агар наливается на предметное стекло или чашку Петри, толщина слоя должна быть 4 - 5 мм, стёкла оставляются при комнатной температуре до полного застывания агара. Если комнатная температура высокая (выше +25°C), то стёкла можно ненадолго поместить в холодильник.

Пробойником в агаре делаются насечки - отверстия диаметром 0,3 см таким образом, чтобы расстояние между лунками с вытяжками и преципитирующими сыворотками было 0,5 - 0,7 см. Расстояние между лунками, в которые должны вноситься преципитирующие сыворотки, должно быть 1,3 - 1,5 см. Можно отверстия располагать в виде "цветочка", то есть - одна центральная лунка с вытяжкой, а вокруг неё располагаются лунки для сывороток.

Препаровальной иглой из лунок удаляется агар, в центральные отверстия вносятся вытяжки, а вокруг в лунки вносятся преципитирующие сыворотки не менее трёх видов (человека, рогатого скота, птицы и др.). Препараты помещаются во влажные камеры, которые ставятся в термостат на 18 - 20 часов при температуре T+37°C.

Учет результатов

При положительной реакции между вытяжкой и соответствующей преципитирующими сывороткой появляется полоса преципитации белого цвета. Титр преципитирующих сывороток проверяется в этой же реакции с применением разведений антигена 1: 1000, 1: 5000, 1: 10 000. Для контроля эта же реакция проводится с вытяжками из предметов - носителей. Для повышения чувствительности некоторые авторы рекомендуют разводить преципитирующие сыворотки в 4 - 16 раз или помещать пластиинки с агаром после проведения реакции в дистиллированную воду на несколько часов (можно вместо воды использовать 0,065% раствор сульфида кадмия на 1 - 2 часа). Можно провести реакцию непосредственно с кусочками ткани, для чего последние помещаются в лунки и заливаются физиологическим раствором хлористого натрия (заливать можно 2 - 3 раза). Постановка реакции аналогична описанной выше. Желательно, чтобы в вытяжках содержание белка не превышало 1: 1000. За реакцией можно наблюдать до 72 часов выдерживания препаратов во влажных камерах в холодильнике.

Установление видовой принадлежности крови реакцией встречного иммуноэлектрофореза

Введение

Сущность метода состоит в том, что в электрическом поле в слабощёлочной среде молекулы сывороточных белков вытяжки, имея отрицательный заряд, движутся от катода к аноду. Наибольшей подвижностью обладают альбумины, наименьшей - гамма - глобулины. Агаровый гель при контакте с раствором электролита тоже приобретает отрицательный заряд, благодаря чему на его поверхности располагаются положительные ионы электролита, которые под действием электрического тока начинают двигаться к катоду (-), увлекая за собой жидкую фазу электролита. Создается так называемый электроэндоосмотический поток, при котором движение альбуминов к аноду тормозится, а гамма - глобулины перемещаются в противоположную сторону - к катоду. Таким образом, глобулиновые фракции иммунных преципитирующих сывороток, содержащие антитела, при электрофорезе вследствие эндоосмоса перемещаются от анода к катоду, а большинство антигенов вытяжки (альбумины) перемещаются от катода к аноду. Следовательно, антитела и антигены под действием электрического тока движутся навстречу друг к другу и в местах контакта образуют преципитаты, видимые в виде белых полос.

Необходимое оборудование, реагенты: агар, дистиллированная вода, агаровый буфер, электродный буфер, пробойник, препаровальная игла, камера для электрофореза, блок питания, набор преципитирующих сывороток и антигенов.

Техника проведения встречного иммуноэлектрофореза

Готовят 2% агар на дистиллированной воде (4 грамма агара на 200 мл дистиллированной воды). К 150 мл расплавленного агара добавляют смесь, состоящую из 100 мл буферного раствора (агаровый буфер) и 50 мл дистиллированной воды, таким образом, в итоге получается 1% агар. Состав буферного раствора: барбитал натрия (медиал) - 10,51 гр., барбитал (веронал) - 1,66 гр., лактат кальция - 1,536 гр., вода дистиллированная до 1 литра.

Приготовленный 1% агар наносится на стеклянные пластиинки размером приблизительно 9 x 12 (размер пластиинки должен соответствовать рамке камеры для электрофореза) и оставляется на 20 - 30 минут при комнатной температуре для застывания агара. Во избежание подсыхания агара пластиинку лучше накрыть пластмассовой или стеклянной крышкой. После полного застывания в геле делают пробойником отверстия по трафарету, который подкладывается под пластиинку с агарам. Из отверстий удаляется агар с помощью препаровальной иглы, глазного скальпеля или пастеровской пипетки. Лунки должны располагаться в два параллельных ряда, расстояние между центрами которых по горизонтали должно быть не более 1 см, расстояние между лунками по вертикали должно быть не менее 1,5 см (см. рисунок №1).

Рисунок № 1

Вытяжка Сыворотка

↓1 см ↓2 см

O→OOO→OO

↓1,5 см

OOOOOO

OOOOOO

OOOOO) O

Полоса преципитации ←

при положительном результате

Катод (-)

(+) Анод

В один ряд лунок помещаются исследуемые вытяжки и разведения заведомых антигенов (для проверки титра), в другой ряд лунок помещаются соответствующие преципитирующие сыворотки. Для контроля в реакцию вводятся также вытяжки из предметов - носителей. Подготовленная таким образом пластиинка помещается на рамку камеры для электрофореза так, чтобы отрицательный электрод (катод) был со стороны вытяжек, а положительный электрод (анод) находился со стороны преципитирующих сывороток. Чтобы после разгонки не перепутать стороны, стекло снизу маркируется стеклографом «+» и «-». Разгонка проводится в специальной камере, в которую наливается электродный буфер (пропись электродного буфера: барбитал натрия (медиал) - 8,760 гр., барбитал (веронал) - 1,380 гр., лактат кальция - 0,384 гр., вода дистиллированная до 1 литра, pH - 8,6). Мостики из фильтровальной бумаги стороны стекла с агарам по длине соединяются с электродным буфером, причём мостики помещаются на стекле так, чтобы край фильтровальной бумаги располагался на агаре на расстоянии 1 см от края пластины. Камера подключается к сети с помощью блока питания. Время разгонки 30 - 40 минут, сила тока рассчитывается следующим образом: сантиметровой линейкой

измеряется длина стекла с агаром и эта величина умножается на 2,5 мА, полученная цифра соответствует силе тока в мА. Например: длина стекла 10см х 2,5 мА, получаем 25 мА. После разгонки стекло с агаром оставляется в закрытой камере на 10 - 20 минут, так как по закону инерции ещё происходит движение ионов. Результат учитывается на тёмном фоне: при положительном результате между вытяжкой и соответствующей преципитирующей сывороткой отмечается полоса преципитации белого цвета. Для лучшего проявления полос преципитации пластинку можно поместить в кювету с дистиллированной водой на 1 час и больше (до 24 часов), чтобы удалить свободные белковые субстанции.

Слой агара после разгонки можно окрасить любым органическим красителем. Для окрашивания отмытая пластинка с агаром помещается в 0,5% раствор амидочерного (или Кумасси, бриллиантового синего, голубого и др.), приготовленного на 10% растворе уксусной кислоты, экспозиция 20 - 30 минут (для других красителей экспозиция от 2 минут). Избыток краски отмывается в нескольких порциях 10% раствора уксусной кислоты. Агаровая пластинка переносится на бумагу, высушивается и прикладывается к заключению.

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. Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Об установлении видовой принадлежности крови в трудно растворимых пятнах.М.,1987.
4. Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР . О подборе преципитирующих сывороток для исследования следов крови, подвергшихся воздействию некоторых подвергающихся факторов.М.,1987.-3с.
5. «Исследование вещественных доказательств» Томилин. М.1962.
6. Методические указания Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Об определении наличия и видовой принадлежности пота. – М, 1976. -8с.
7. Методические рекомендации Главного судебно-медицинского эксперта СССР. Установление видовой принадлежности крови и некоторых других биологических объектов методом встречного иммуноэлектрофореза (электропреципитация). –М, 1976. -15с.
8. Методические указания Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Об определении видовой специфичности белков в объектах биологического происхождения методом встречного электрофореза на ацетат-целлюлозной пленке. –М, 1983. -9с.
9. Методические рекомендации Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Об использовании метода иммунофлюoresценции для установления видовой принадлежности крови и изолированных клеток в следах на вещественных доказательствах. –М, 1983. -15с.