



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
(125284, Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ
СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ И СУДЕБНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Москва

2024

УДК: 340.6

ББК: 58

Разработчики методических рекомендаций:

**Макаров И.Ю., Гусаров А.А., Сурикова Н.Е., Исакова И.В.,
Сабчук Э.П., Сидоров В.Л.**

Рецензенты:

Эмануэль Владимир Леонидович – заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, академик Метрологической академии;

...

Аннотация

В методических рекомендациях изложена актуальная информация о правилах проведения судебно-биологических и судебно-цитологических экспертиз и исследований. Представлены методы, методики, тактические подходы и алгоритмы, применяемые при проведении экспертиз по объектам различного биологического происхождения: кровь, выделения, волосы, частицы органов и тканей, изолированные клетки. Подробно изложены способы установления наличия биологических следов, их видовой, групповой и половой принадлежности.

Методические рекомендации предназначены для врачей – судебно-медицинских экспертов, судебных экспертов, лаборантов отделений судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы бюро судебно-медицинской экспертизы.

Методические рекомендации согласованы с Ассоциацией ... («__» _____ 202_ г., протокол № ____).

Методические рекомендации утверждены решением Ученого совета ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России («__» _____ 202_ г., протокол № ____).

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1. СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ, ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	9
2. СПОСОБЫ ИЗЪЯТИЯ И УПАКОВКИ ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ СО СЛЕДАМИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МЕСТЕ ПРОИСШЕСТВИЯ	14
3. СПОСОБЫ И ТЕХНИКА ИЗЪЯТИЯ ОБЪЕКТОВ ОТ ТРУПОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ	16
4. СПОСОБЫ И ТЕХНИКА ИЗЪЯТИЯ ОБЪЕКТОВ У ЖИВЫХ ЛИЦ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ	20
5. ПРАВИЛА И ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ	23
6. ОБЩИЙ АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО- БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ	28
7. ЭКСПЕРТИЗА КРОВИ	30
7.1. Установление наличия крови	30
7.2. Установление видовой принадлежности крови	35
7.3. Установление групповой принадлежности крови по системе АВ0	41
7.4. Выявление антигенов системы MNSs	60
7.5. Выявление антигена D системы Резус в пятнах крови	61
7.6. Определение фенотипов гаптоглобина	61
7.7. Дифференцирование периферической и менструальной крови	66
7.8. Дифференцирование крови плода и взрослого человека в пятнах крови	68
7.9. Установление давности и прижизненности образования пятен крови	70

8. ЭКСПЕРТИЗА ВЫДЕЛЕНИЙ	73
8.1. Установление наличия слюны	73
8.2. Установление наличия мочи	76
8.3. Установление наличия пота	77
8.4. Установление наличия спермы	78
8.5. Установление групповой принадлежности выделений	84
9. ЭКСПЕРТИЗА ВОЛОС	87
9.1. Стандартный алгоритм проведения экспертизы сходства-различия волос	87
9.2. Основные этапы исследования волос, представленных на экспертное исследование	87
9.3. Экспертное исследование морфологических признаков волос	88
9.4. Сравнительное экспертное исследование волос	91
9.5. Установление групповой принадлежности волос реакцией абсорбции-элюции	92
9.6. Установление групповой принадлежности волос реакцией смешанной агглютинации	95
9.7. Установление половой принадлежности волос	96
10. ЭКСПЕРТИЗА ПРОЧИХ ОБЪЕКТОВ	97
11. СУДЕБНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ, ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	98
11.1. Порядок взятия материала для судебно-цитологической экспертизы и исследования	100
11.2. Общий алгоритм судебно-цитологической экспертизы и исследования	103
11.3. Характеристика и свойства цитологических красителей, приготовление рабочих растворов	104
11.4. Техника окраски цитологических препаратов	107
11.5. Установление половой принадлежности крови и клеток	109
11.5.1. Диагностика половой принадлежности клеток по X-хроматину	110

11.5.2. Диагностика половой принадлежности клеток и крови по Y-хроматину	111
11.5.3. Диагностика полового происхождения крови по полоспецифическим отросткам	112
11.6. Комплексное исследование биосубстрата по делам о половых преступлениях	114
11.7. Комплексное исследование многокомпонентных пятен	116
12. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ ОФОРМЛЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ И СУДЕБНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ	118
13.ОФОРМЛЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ЭКСПЕРТА	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	158
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	159
СОСТАВ РАЗРАБОТЧИКОВ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ	171

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

HbA – гемоглобин взрослых
HbF – фетальный гемоглобин
Hr – гаптоглобин
IgG – иммуноглобулин G
АГ – антиген
АТ – антитело
АЦП – ацетатцеллюлозная пленка
ВИЭФ – встречный иммуноэлектрофорез
дот-ИФА – точечный твердофазный иммуноферментный анализ
ИФА – количественный твердофазный иммуноферментный анализ
ИХА – иммунохроматографический анализ
КРА – количественная реакция абсорбции
КРАЭ – количественная реакция абсорбции-элюции
КФ – кислая фосфатаза
МКАТ – моноклональные антитела
НЦМ – нитроцеллюлозная мембрана
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – простатический специфический антиген человека
РАЭ – реакция абсорбции-элюции
РИФ – реакция иммунофлюоресценции
РКП – реакция кольцепреципитации
РПА – реакция преципитации в агаре
РСА – реакция смешанной агглютинации
СФМ – спектрофлуориметрия
СЭО – судебно-экспертная организация
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФЛ – ультрафиолетовые лучи

ВВЕДЕНИЕ

Судебно-биологическая экспертиза является одним из видов экспертизы вещественных доказательств, которая проводится с целью определения наличия, видовой, групповой и половой принадлежности, а также иных признаков объектов биологического происхождения: крови, выделений, волос, частиц органов и тканей организма с применением специальных лабораторных методов исследования.

Судебно-медицинская экспертиза вещественных доказательств биологического происхождения в нашей стране начала зарождаться в начале XIX века, и, в отличие от многих других видов судебно-медицинской экспертизы, приобретала свое доказательное значение постепенно, проходя определенные исторические этапы, развивая при этом собственные методики и вбирая в себя научные методы из различных областей знаний, адаптируя их для решения специфических задач.

Всего в динамике формирования, становления и исторического развития отечественной экспертизы вещественных доказательств биологического происхождения, можно выделить 7 условных временных периодов [16]:

I период (с 1800 по 1860 гг.) – эмпирического накопления знаний по исследованию вещественных доказательств биологического происхождения и отсутствие достоверных (доказательных) методов их исследования.

II период (с 1860 по 1919 гг.) – внедрения в практику исследования вещественных доказательств, производимых во врачебных отделениях губернских правлений и на кафедрах университетов, доказательных методов по определению наличия (микрористаллические реакции, спектральный метод) и видовой принадлежности крови (реакция преципитации), микроскопических методов исследования пятен спермы, методов и алгоритмов изучения макро- и микроскопических признаков сходства и различия волос.

III период (с 1919 по 1930 гг.) – создания судебно-медицинских лабораторий нового типа и внедрения в экспертную практику метода

исследования групповой принадлежности жидкой крови по системе АВ0, качественной реакции абсорбции для установления групповой принадлежности крови в пятнах на вещественных доказательствах.

IV период (с 1930 по 1950 гг.) – формирования современных алгоритмов исследования вещественных доказательств, внедрения в экспертную практику количественной реакции абсорбции агглютининов для установления групповой принадлежности пятен крови по системам АВ0 и MN, определения групповой принадлежности пятен выделений.

V период (с 1950 по 1960 гг.) – создания штатных судебно-биологических подразделений в структуре бюро судебно-медицинской экспертизы и стройной системы профессиональной переподготовки и повышения квалификации экспертов-биологов на кафедрах судебной медицины факультетов усовершенствования врачей.

VI период (с 1960 по 1995 гг.) – интенсивного развития всех видов судебно-биологических исследований крови, выделений, волос, клеток; внедрения в экспертную практику хроматографических, электрофоретических, цитологических методов, новых видов иммунологических реакций.

VII период (с 1995 г. по настоящее время) – интенсивного развития и внедрения в экспертную практику молекулярно-генетических методов исследования вещественных доказательств и модернизации экспертной деятельности судебно-биологических подразделений государственных судебно-медицинских экспертных учреждений.

В настоящее время судебно-медицинская биология обладает большим арсеналом методов и может решать широкий спектр задач, поставленных следствием. Алгоритмы исследования вещественных доказательств биологического происхождения, разработанные за время ее существования, доказали свою практичность и жизнеспособность.

1. СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ, ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Судебно-медицинская биология – это раздел судебной медицины, представляющий собой систему научных знаний о способах и методах исследования следов (объектов) биологического происхождения, являющихся источником доказательств при проведении предусмотренного законом расследования.

Судебно-биологическая экспертиза – это подвид судебно-медицинской экспертизы, которая решает задачи установления биологической природы изучаемых объектов и возможности их происхождения от конкретных лиц с помощью определенных алгоритмов, сочетающих в себе морфологические, физико-химические, иммунологические (серологические) и другие специальные лабораторные методы, способы, методики и реакции.

Правила организации деятельности отделения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы и проведения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы регламентированы Приложением № 8 к Порядку проведения судебно-медицинской экспертизы, утвержденному приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25.09.2023 № 491н.

Судебно-биологические экспертизы выполняются экспертами отделений судебно-биологической экспертизы судебно-экспертных организаций (далее – СЭО), имеющими специальную подготовку.

Судебно-цитологические экспертизы выполняются врачами – судебно-медицинскими экспертами отделений судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы СЭО, имеющими соответствующую подготовку по судебно-медицинской цитологии (далее – эксперт-цитолог).

Помещения для отделения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы СЭО должны быть светлыми, с естественным и искусственным освещением, с наличием вытяжной вентиляционной системы и располагать следующим перечнем помещений:

1. Кабинет эксперта.
2. Кабинет лаборанта.
3. Кабинет для работы с трупным материалом.
4. Кабинет для проведения лабораторных исследований.
5. Помещение для хранения вещественных доказательств.
6. Аппаратная.
7. Люминесцентная (для работы с люминесцентными микроскопами).
8. Кабинет для забора крови.
9. Электрофоретическая.
10. Моечная комната (для лабораторной посуды).
11. Кладовая.
12. Помещение для архива.
13. Комната для приема пищи.
14. Комната для переодевания.

Объектами судебно-биологической экспертизы являются образцы жидкой крови от живых лиц и трупов; следы крови, следы выделений, волосы, представленные для проведения судебно-биологических экспертиз и исследований; ногтевые пластины, фрагменты (кусочки) поперечно-полосатой мышечной ткани и фрагменты (кусочки) костной ткани от скелетированных, гнилостно измененных и неопознанных трупов, на предмет установления их групповой принадлежности по системе АВ0; срезы ногтевых пластин от живых лиц и трупов для исследования наличия крови и выделений.

Микрочастицы органов и тканей, обнаруженные при осмотре мест происшествий, на орудиях травмы, вещественных доказательствах, являются объектами судебно-цитологической экспертизы.

Срезы ногтевых пластин, для исследования состава подногтевого содержимого (эпителиальных клеток) при расследовании насильственных действий, половых преступлений или подозрении на них исследуются экспертами-цитологами.

Целью судебно-биологической экспертизы является определение наличия, вида, групповой принадлежности и иных признаков объектов биологического происхождения (кровь, выделения, волосы и пр.) с применением специальных лабораторных методов исследования для установления возможности их происхождения от конкретных лиц, проходящих по делу.

Под понятием «объект» на исследуемом предмете понимают след (или объединение нескольких следов или условно разделенные на отдельные участки обширные пятна), в котором обнаружен какой-либо биологический субстрат, подвергающийся дальнейшему исследованию.

Следы, в которых не выявлены биологические компоненты, но исследованы на предмет установления их наличия, также обозначаются объектами и подсчитываются при учете объектов исследования

Единица учета (ранее – объект исследования) экспертной деятельности эксперта отделения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы – это подсчет всех исследований, которые были проведены с объектом на вещественном доказательстве (исследованном предмете).

Указанный подсчет осуществляют следующим образом:

– наличие крови: по использованным методикам (не по вырезкам из пятна), то есть если одной методикой присутствие крови не установлено, то применяется следующая, и это учитывается как два объекта / исследования или две единицы учета и т.д./;

– вид крови: также по примененным методикам (без учета контролей и количества введенных в реакцию сывороток);

– группа крови – (AB0): если речь идет о реакции абсорбции-элюции, то в учет идет количество изученных на объекте участков, то есть из одного обозначенного объекта исследованию подвергнуто пять участков, следовательно, это 5 единиц учета; далее в учет вносятся все повторные исследования с этим объектом, если они требуются для уточнения результатов исследования. Сыворотки и контроли не учитываются (если, например,

повторы касаются только одной сыворотки, все равно полноценная единица учета). Это же по сути распространяется и на количественную абсорбцию; если эксперты приготовили из объекта навески для альфа-, бета- и анти-Н из трех мест – это три единицы учета, независимо от числа введенных в реакцию сывороток. В реакции покровного стекла во избежание использования различных коэффициентов с учетом несложности этой реакции целесообразно вести подсчет по обозначенным объектам;

– группа крови по иным системам: учет аналогичен – по числу изученных участков и всех повторов реакций и их модификаций.

При внедрении новых методик по любому виду исследования целесообразно вводить коэффициенты с целью заинтересовать эксперта в подобном внедрении; этот коэффициент в отделении может быть различным (зависит от сложности разработанной методики);

– группа выделений: те же требования, что и в работе с кровью, если речь идет о групповой принадлежности;

– наличие спермы: чаще всего речь идет о концентрированном извлечении сперматозоидов; подсчет следует вести по числу приготовленных вытяжек; если эксперт работает с фитоагглютинационным методом, то вводится коэффициент 1:6; при работе с реакцией подавления КФ-ингибитором – 1:3. Следует иметь в виду, что в тех случаях, когда речь идет об единичных участках, подвергнутых этим исследованиям, то вводить коэффициенты не нужно.

Наличие слюны: по числу вырезок (навесок).

Наличие пота: в основном по изучаемым объектам.

Подногтевое содержимое: ногтевые фрагменты с каждой руки следует объединять, а не изучать каждый ноготь в отдельности, и вести подсчет соответствующим образом – 2 единицы учета (не 10).

Волосы: морфология каждого волоса («улика» и образец) – 1 единица учета; групповая принадлежность – каждый введенный в реакцию волос – это отдельная единица учета, но если от волоса изучено несколько участков, то

все они должны быть учтены. Сравнительное исследование – количество тех пар волос, которые сравнивали с применением микроскопии.

Изложенное является схемой, которая распространяется на наиболее частые в судебной биологии виды исследований. От этой схемы возможны отклонения, связанные со сложностью отдельных экспертиз. Все схемы должны утверждаться приказом руководителя СЭО.

Под понятием «предмет» понимают каждую вещь, представленную на экспертизу, каждый образец крови, выделений от проходящих по делу лиц; волосы – улики по местам изъятия; волосы – образцы – по областям изъятия (голова, лобок, ноги, руки и т.д.).

2. СПОСОБЫ ИЗЪЯТИЯ И УПАКОВКИ ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ СО СЛЕДАМИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МЕСТЕ ПРОИСШЕСТВИЯ

При осмотре места происшествия изымаются все предметы со следами, похожими на кровь, или на следы различных выделений человеческого организма – спермы, слюны, пота, мочи и др. В обязательном порядке изъятию в необходимых случаях подлежат кости, органы и их части, волосы или объекты, похожие на них.

В зависимости от объекта, на котором находятся следы крови или выделений, от влияния на эти следы внешних факторов, от давности их образования нельзя исключить вероятность того, что часть следов может остаться незамеченной. Поэтому целесообразно изъятие и тех предметов, на которых наличие этих следов лишь предполагается. Если позволяют размеры вещественного доказательства, то предметы изымаются целиком и упаковываются таким образом, чтобы исключить изменение или утрату следов биологического материала.

Обязательным условием для обеспечения сохранности образцов до проведения экспертного исследования является предварительное высушивание влажных предметов-носителей биологического субстрата при комнатной температуре.

При невозможности изъятия предмета-носителя (из-за больших размеров или иных причин) отбор образцов для судебно-биологического экспертного исследования осуществляется следующим образом:

- изготовление выреза или выпилов предмета с участком, на котором расположен след, подлежащий исследованию в условиях отделения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы;

- приготовление соскобов – чистым скальпелем или бритвой осторожно соскабливают помарку или пятно на лист бумаги. Аналогично берут контрольный образец с расположенной рядом незапятнанной поверхностью;

– приготовление смывов – небольшие кусочки чистого бинта (для смывов чужеродных потожировых выделений размер тампона не должен превышать 1,5×1,5 см) или ткани слегка увлажняют водой и без нажима протирают тампоном видимые следы. Таким же образом готовят смыв с незапятнанного участка, расположенного вблизи пятна, в качестве контрольного смыва предмета-носителя. Тампоны для смывов должны браться от одного куска бинта или чистой ткани. При приготовлении смывов необходимо надевать резиновые перчатки и брать тампон пинцетом. Для обнаружения чужеродных потожировых выделений на теле жертвы смывы делают в местах их наиболее вероятного присутствия – с шеи, вокруг рта, кистей рук и т.д.

Пятна, находящиеся на грунте, изымаются вместе с грунтом, желательно на всю глубину пропитывания. Изъятый грунт рассыпается тонким слоем на тарелку, просушивается, упаковывается в бумажные пакеты и направляется на исследование. Контрольные образцы подготавливаются аналогично.

Кровяные пятна со снега, равно как и пятна жидкой крови, спермы, мочи, собираются на чистую марлю (бинт), сложенную в несколько слоев. Марлю с изъятым образцом кладут на дно какого-либо сосуда, высушивают, упаковывают и передают на исследование. Обязательно прикладывается контрольный образец марлевого тампона (если бралось пятно со снегом, то контрольный образец должен быть пропитан незапятнанным снегом и высушен).

Волосы, или объекты их напоминающие, собираются пинцетом в отдельные пакетики, изготовленные из бумаги, упаковываются по местам изъятия и направляются на экспертное исследование

3. СПОСОБЫ И ТЕХНИКА ИЗЪЯТИЯ ОБЪЕКТОВ ОТ ТРУПОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ

Взятие биологических объектов от трупа осуществляет врач – судебно-медицинский эксперт отделения судебно-медицинской экспертизы трупов, который проводит исследование трупа.

От трупа могут быть взяты: образец крови, волосы, образец поперечнополосатой мышечной ткани, ногти, тампоны с содержимым влагалища, ротовой полости, прямой кишки, образец желчи, образец мочи, зубы, фрагменты костей, ногтевые пластины, срезы ногтевых пластин для последующих судебно-биологических экспертных исследований. Количество и характер изымаемых объектов, а также необходимые виды их исследований определяет эксперт, исходя из поставленных на разрешение экспертизы вопросов и особенностей данного случая.

Обязательному взятию и передаче органу или лицу, назначившему судебно-медицинскую экспертизу трупа, подлежат:

- кровь для определения антигенной принадлежности по системе АВ0 и другим системам – при насильственной смерти, сопровождавшейся наружными повреждениями или кровотечением; убийствах или подозрении на них; половых преступлениях или подозрении на них; исследовании трупов неизвестных лиц;

- срезы ногтевых пластин с подногтевым содержимым пальцев рук – при убийстве или подозрении на него, половых преступлениях;

- тампоны и мазки содержимого влагалища для обнаружения спермы, изучения морфологических особенностей влагалищного эпителия и др. – при половых преступлениях или подозрении на них; при подозрении на совершение полового акта в извращенной форме берут тампоны и мазки со слизистой оболочки рта и прямой кишки у трупов обоего пола; при подозрении на половые преступления целесообразно брать смывы на

тампонах с поверхности кожи, прилегающей к половым органам и анальному отверстию;

– волосы с пяти областей головы (лобная, затылочная, теменная, правая и левая височные) и лобка для сравнительного исследования - при убийстве или подозрении на него, половых преступлениях или при подозрении на них, транспортных травмах; повреждении волосистой части головы; исследовании трупов неизвестных лиц.

Кровь направляют в отделение судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы в жидком виде. Кровь в количестве 3-5 мл берут из полостей сердца или крупных сосудов, бедренной вены, синуса твердой мозговой оболочки стерильной пипеткой или шприцом и помещают в чистую пробирку (флакон, контейнер), которую закрывают резиновой или корковой пробкой, либо завинчивают крышкой, на пробирку наклеивают этикетку с указанием наименования взятого образца, фамилии и инициалов умершего, регистрационного номера трупа, фамилии эксперта и даты исследования трупа; пробирку опечатывают. При отсутствии жидкой крови образец получают путем протирания стенок крупных сосудов и полостей сердца, при этом используют двуслойную марлю размерами 5×5 см, допустимо изготовление пятна крови вложением марли в поперечный разрез мышцы. При невозможности своевременного направления жидкой крови в отделение судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы стерильный бинт (марлю) складывают в 5-6 слоев и пропитывают кровью из пипетки или шприца на участке диаметром 5,0-6,0 см, бинт высушивают на листе чистой бумаги при комнатной температуре в чистом помещении морга (кроме секционного зала и трупохранилища). Высушиваемый образец нельзя помещать вблизи нагревательных приборов и подвергать прямому воздействию солнечных лучей и загрязнению. Высушенный образец и часть использованного для получения пятна чистого бинта (для контроля) помещают в отдельные пакеты, которые маркируют, заклеивают и опечатывают.

Любое минимальное количество жидкой крови для определения группы предпочтительнее образца высушенной крови, а любое минимальное количество крови на марле – лучший вариант по сравнению с образцом мышцы или других тканей трупа.

Не рекомендуется брать кровь из полостей (брюшной, грудной, черепной), по следующим причинам: вследствие изменения выраженности групповых факторов в образце за счет примеси выделений; вследствие разрушения эритроцитов (гемолиза) при контакте с другими жидкостями организма; вследствие получения неспецифических результатов исследования; вследствие загрязнения крови микроорганизмами.

При полной невозможности взять образцы крови (скелетированный, гнилостно измененный, мумифицированный труп и т.д.), берут либо кусочки поперечнополосатой мышечной ткани размерами $1 \times 1 \times 0,5$ см, в которых в меньшей степени выражены гнилостные изменения, ногти, волосы, либо большой коренной зуб (6-7-8 зубы) на верхней челюсти без болезненных изменений, либо фрагменты трубчатых костей. Кусочки поперечнополосатой мышечной ткани помещают в чистую стеклянную посуду, которую закрывают пробкой, маркируют, печатают и хранят в холодильнике. В случае длительной транспортировки взятые кусочки высушивают при комнатной температуре. Ногти берут вместе с ростковым слоем с двух пальцев каждой кисти. Из скелетированного трупа берут 2-3 фрагмента костей, имеющих губчатое мозговое вещество. Волосы изымают (выдергивают) вместе с луковицами и влагалищными оболочками. Образцы волос берут из различных областей тела, в зависимости от обстоятельств дела и задачи исследования. Для целей идентификации личности умершего и при наличии повреждений в области головы берут волосы с лобной, обеих височных, теменной и затылочной областей, а также из области повреждений. Для этого пальцами выдергивают из каждой указанной области по 15-20 волос с влагалищными оболочками и луковицами. Аналогичным способом берут (при необходимости) образцы волос с других областей тела. Волосы помещают в

отдельные, заранее маркированные пакеты, которые укладывают в общий пакет. Последний заклеивают, прошивают нитками и концы ниток опечатывают на прикрепленном к ним кусочке картона.

Для посмертного исследования категории выделительства берут желчь, а при ее отсутствии – мочу или перикардальную жидкость. Для этого желчный пузырь, перикард или мочевого пузырь протирают вначале чистой влажной, а затем сухой марлей и вскрывают стенку чистым сухим ножом (скальпелем). Шприцом набирают 3-5 мл желчи, мочи или перикардальной жидкости и помещают в чистую пробирку (флакон), который закрывают пробкой, маркируют и опечатывают. При длительной транспортировке желчь (мочу, перикардальную жидкость) предварительно выливают на чистую марлю и высушивают.

При половых преступлениях или подозрении на них дополнительно берут (выдергивают) волосы с верхней и нижней частей лобка (по отдельности) и промежности также в количестве 15-20 штук. Каждый пучок упаковывают отдельно и маркируют. Кроме того, при половых преступлениях и при подозрении на них берут марлевым тампоном содержимое влагалища с его сводов. Тампон высушивают при комнатной температуре и направляют на исследование в промаркированном пакете. Одновременно в отдельном пакете направляют чистый тампон для контроля. Для взятия содержимого прямой кишки тампон вводят на глубину 3-6 см. Содержимое полости рта следует брать двумя тампонами – одним протирают слизистую оболочку губ, щек, десен, зубы, другим берут содержимое лакун и миндалин. Все тампоны с образцами перед упаковкой высушиваются.

4. СПОСОБЫ И ТЕХНИКА ИЗЪЯТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ЖИВЫХ ЛИЦ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ

Решение вопроса о возможности происхождения биологических следов от конкретного лица требует предоставления образцов для сравнительного исследования, в качестве которых могут быть предоставлены кровь, слюна, волосы, сперма (по отдельному запросу).

Образцы жидкой крови у живого лица берут из пальца или локтевой вены, в количестве 3-5 мл, помещают в чистую пробирку, которую закрывают резиновой или корковой пробкой, либо завинчивают крышкой, на пробирку наклеивают этикетку с указанием наименования взятого образца, фамилии и инициалов живого лица, регистрационного номера, фамилии работника, взявшего кровь, даты; пробирку опечатывают. При невозможности направления крови в жидком виде, а также для возможного дублирования исследований обязательно представление образцов на марлевом тампоне. Тампон пропитывается кровью до получения пятна 5×5 см (с пропитыванием нескольких слоев марли), высушивается и направляется на исследование.

Для взятия образца слюны – лицо, в отношении которого проводится экспертное исследование, должно прополоскать рот водой, затем следует положить ему под язык марлевый тампон, после обильного пропитывания слюной извлечь его пинцетом, высушить при комнатной температуре, упаковать.

Образцы волос необходимо изымать во всю длину, захватывая пучок волос руками, срезают волосы под корень, с пяти областей головы: лобной, теменной, затылочной и двух височных. В пучке должно быть не менее 15-20 волос. Региональные волосы берут с обеих конечностей (правой и левой); из обеих подмышечных областей; с половых органов: как минимум с двух мест лобка: (верхней и нижней по отдельности) и промежности; с других частей

тела – груди, живота, спины. Короткие волосы сбривают. Каждый пучок упаковывают отдельно и маркируют.

В качестве биологического материала, с вероятным содержанием следов преступления на экспертизу могут быть предоставлены: мазки и тампоны с содержимым влагалища, ротовой полости, прямой кишки; ногтевые срезы; мазки-отпечатки и смывы с полового члена.

Содержимое влагалища у женщин целесообразно брать сразу после совершения преступления – сохранность сперматозоидов в половых путях живых женщин составляет 5-7 дней (при условии, если потерпевшая не предпринимала никаких гигиенических манипуляций), но количество их резко уменьшается уже в течение первых суток. Содержимое влагалища берется на чистый марлевый тампон, при этом обрабатываются своды, наружный зев и шейка матки. Отработанным тампоном на чистые предметные стекла наносятся поверхностные мазки, подсушиваются, упаковываются и подробно надписываются.

Содержимое полости рта у потерпевших желательно изымать в течение нескольких часов с момента совершения преступления. Аналогично марлевым тампоном протирается слизистая оболочка губ, щек, десен, зубов, лакуны, миндалины, после чего высушивается;

Содержимое прямой кишки у потерпевших следует брать до акта дефекации. Предварительно производится смыв вокруг анального отверстия (тампон исследуется отдельно), после этого новым тампоном берут содержимое прямой кишки, вводя тампон на глубину 3-6 см.

Все тампоны с образцами до этапа упаковки и транспортировки должны быть высушены в надлежащих условиях.

Ногтевые пластины срезают очень острыми ножницами по краю мякоти пальцев, стараясь не повредить мягких тканей и полностью захватить выступающий край ногтевой пластины. В случае предельно короткой длины свободного края ногтевых пластин, если срезать ее не представляется

возможным, производят смывы по верхнему краю пластин и ногтевого ложа. Ногтевые срезы и смывы упаковывают отдельно с каждой руки.

При взятии мазков-отпечатков с полового члена следует учитывать, что проведение подозреваемым гигиенических мероприятий способно полностью исключить возможность обнаружения чужеродного биологического материала. Как правило, безрезультатно изъятие мазков-отпечатков позднее, чем через 3 дня после совершения преступления. При взятии отпечатков чистые, слегка смоченные водой предметные стекла одной из сторон плотно прикладываются к наружной поверхности полового члена, внутренней поверхности крайней плоти венечной борозды, к головке полового члена. Отпечатки просушивают, стекла складывают отпечатками внутрь, проложив между ними спички, и связывают, предварительно промаркировав каждое стекло. Стекла укладывают в коробки и направляют на исследование. При взятии смывов, что менее желательно, марлевыми тампонами, слегка смоченными водой, протирают названные выше участки, тампоны подсушивают, упаковывают и направляют на исследование.

5. ПРАВИЛА И ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ

Поступающие в СЭО вещественные доказательства (вместе с постановлением) принимает заведующий отделением судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы или уполномоченный сотрудник СЭО.

Для проведения судебно-биологической экспертизы предоставляются:

- постановление (определение) о назначении судебно-биологической экспертизы, в котором излагаются обстоятельства дела; поставленные вопросы, требующие разрешения; перечисляются объекты, подлежащие исследованию;

- образцы (кровь, выделения, волосы и др.) и вещественные доказательства необходимые для проведения данной конкретной экспертизы;

- копия протокола, в котором отражено изъятие вещественных доказательств и образцов для сравнительного исследования;

- необходимые для проведения экспертизы документы (заключение судебно-медицинской экспертизы трупа или живого лица; материалы уголовного дела; справки или копии документов с информацией о групповой принадлежности крови проходящих по делу лиц).

В тех случаях, когда необходимые материалы не представлены, эксперт запрашивает их. В первую очередь это относится к образцам для сравнительного исследования, без которых не может проводиться экспертиза. При отсутствии подозреваемого (или потерпевшего) экспертизу производят без образцов с целью получения сведений, необходимых для розыска преступника.

Датой начала экспертизы является дата поступления последнего из запрошенных объектов экспертизы. Заведующий отделением судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы передает вещественные доказательства и документы к ним эксперту-исполнителю.

В отделении судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы в обязательном порядке ведутся следующие журналы:

- журнал приема, регистрации и выдачи объектов экспертизы;
- журнал проверки хранения объектов экспертизы;
- журнал регистрации мазков и тампонов;
- журнал регистрации жидкой крови живых лиц
- журнал регистрации крови и иных образцов, изъятых из трупов;
- журнал учета спирта;
- журнал проверки реагентов.

Перечисленные документы хранят в СЭО в течение следующего времени: регистрационные журналы – 25 лет; копии заключений экспертов – 25 лет; журналы учета спирта, микродонорства, проверки реагентов – 3 года.

Поступившие объекты экспертизы хранят в условиях, исключающих их хищение, утрату, порчу или видоизменение: в металлических шкафах (сейфах) экспертов, которым поручено их исследование. Объекты биологического происхождения хранятся в холодильнике (морозильнике), который по окончании работы опечатывается специально назначенным сотрудником, определяемым приказом руководителя СЭО.

Число экспертов, необходимое для проведения конкретной экспертизы, определяет заведующий отделением судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы.

При производстве экспертизы каждый эксперт обязан вести рабочие записи, отмечать свои ежедневные действия, а именно: подробное отражение номеров на объектах, приданных изучаемым следам; основные параметры опытов; сведения о реагентах (титр, разведение, специфичность, изготовитель, срок годности и т.д.); данные о контрольном материале, вводимом в реакции. Получаемые результаты должны фиксироваться в специальных рабочих таблицах (кроме экспертизы волос, так как последние описывают в отдельном журнале), где указывают данные по каждому объекту, предмету-носителю, заведомому образцу. Не рекомендуется объединять разные объекты, по

которым получены одинаковые результаты. При описании вещественных доказательств эксперт обязан отметить состояние упаковки, в которую они помещены, наличие оттисков штампов, печатей и удостоверительных подписей. При нарушении упаковки составляется акт, который подписывают три сотрудника отделения. Аналогичный документ составляют и в отсутствие какого-либо предмета или образца, указанного в сопроводительном документе. Один экземпляр акта направляют лицу или органу, назначившему экспертизу.

Во избежание ошибок, работая над несколькими экспертизами, следует принимать все меры предосторожности (четкие подробные рабочие таблицы, внимательное обозначение объектов и др.).

По окончании экспертизы вещественные доказательства в упакованном и опечатанном виде вместе с образцами возвращают органу или лицу, назначившему экспертное исследование. Биологический архив (кровь на марле) после исследований хранится в сухом проветриваемом помещении. В случае порчи биологического архива или его непригодности к дальнейшему хранению составляется акт, который направляется органу или лицу, назначившему экспертизу.

По окончании исследования невостребованные объекты экспертизы, представленные объектами биологического происхождения, должны быть пронумерованы и храниться в архиве СЭО в упаковке, обеспечивающей их сохранность. Сроки хранения невостребованных объектов экспертизы, представленных объектами биологического происхождения, а также оставленных на ответственное хранение в архиве биологического материала, составляют:

пять лет – для объектов экспертизы, представленных объектами биологического происхождения, оставленных на ответственное хранение, образцов трупной крови в случаях насильственной смерти, образцов биологического материала от неопознанных трупов;

три года – для тампонов и мазков содержимого ротовой полости, влагалища, прямой кишки;

один год – для образцов биологического материала от опознанных трупов в случаях ненасильственной смерти.

По окончании срока хранения в адрес органа или лица, назначившего экспертизу, направляется ходатайство о даче разрешения на утилизацию объектов.

При дополнительной экспертизе необходимо проведение только тех исследований, которые при предыдущей не проводились. Подобную экспертизу может проводить как эксперт-исполнитель, так и любой другой.

При повторной экспертизе должны проводиться все первичные исследования, а также те, которые ранее не применялись. Целесообразно при повторной экспертизе сохранить первичные обозначения объектов.

Проводя экспертизу и разрешая вопросы следствия, эксперт вправе в порядке экспертной инициативы и в пределах своей компетенции проводить иные исследования и решать вопросы, которые не указаны в постановлении, но имеющие, по мнению эксперта, значение для дела.

Ответственность за правильность проведения экспертизы (точное соблюдение методических рекомендаций, тактику и др.) несет эксперт-исполнитель.

Судебно-биологическую экспертизу производят в следующей последовательности:

- изучение документов;
- осмотр упаковки и ее описание;
- осмотр и описание вещественных доказательств;
- определение наличия объектов биологического происхождения (производится по ходу описания вещественного доказательства);
- составление плана проведения экспертизы в соответствии с выявленными объектами и имеющимися методиками;

- определение видовой, групповой, половой принадлежности объектов с целью разрешения вопросов, поставленных следователем или судом;
- составление экспертных выводов;
- оформление Заключения эксперта.

При проведении специальных исследований по установлению наличия, вида, группы, пола и т.д. расхождение объектов производят таким образом, чтобы обеспечить полноту исследования, а также возможность дополнительных или повторных действий с ними. Исключение составляют экспертизы с чрезвычайно малыми объектами, без полного уничтожения которых невозможно решить вопросы, поставленные следствием.

Жидкая кровь и иные скоропортящиеся материалы должны быть исследованы не позднее следующего дня их поступления в отделение.

Маркировка объектов должна быть четкой и остаться неизменной при исполнении одной экспертизы во всех реакциях.

Перед проведением каждого исследования и в зависимости от его вида проверяют пригодность используемых реактивов и реагентов (их специфичность и активность).

Проведение экспертных исследований вещественных доказательств и объектов биологического и иного происхождения осуществляют с соблюдением мер предосторожности, которые исключают попадание на объекты экспертизы биологического материала от эксперта и лиц, принимающих участие в выполнении этих исследований.

6. ОБЩИЙ АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ И ИССЛЕДОВАНИЙ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ

Судебно-биологическая экспертиза проводится с целью определения наличия, видовой и групповой принадлежности объектов биологического происхождения: крови, выделений, волос, различных тканей человека для установления возможности их происхождения от определенного лица с применением специальных лабораторных методов.

В судебной биологии используются три вида методов: морфологические, физико-химические, иммунологические.

Общий алгоритм проведения судебно-биологической экспертизы (исследования) включает в себя три основных этапа:

1. Предварительный этап:

– изучение документов (постановления (определения), материалов дела), оценка соответствия наименования и количества предметов и объектов, поступивших на исследование с перечнем, изложенным в постановлении (определении);

– осмотр и описание упаковки, осмотр и описание вещественных доказательств;

– подготовка плана проведения экспертизы в соответствии с поставленными вопросами, объектами и имеющимися методиками.

2. Основной этап (лабораторных исследований):

– определение наличия биологического субстрата на вещественных доказательствах: крови, выделений, волос, частиц органов и тканей;

– установление видовой принадлежности биологических объектов;

– определение групповой принадлежности объектов;

– решение других вопросов, интересующих следствие

3. Заключительный этап (оформления результатов исследований):

– оформление исследовательской части экспертного документа;

– формулирование экспертных выводов;

- подготовка приложений (таблиц);
- проверка экспертного документа, выдача заключения эксперта.

Среди многообразия судебно-биологических экспертиз и различных сочетаний исследуемых биологических объектов выделяют следующие основные виды:

- экспертиза крови;
- экспертиза выделений;
- экспертиза волос;
- экспертиза тканей (мышц, костей, ногтей, зубов).

7. ЭКСПЕРТИЗА КРОВИ

План проведения экспертизы соответствует общим принципам: выявление следов, напоминающих кровь; определение ее наличия, вида, группы.

Половую принадлежность крови определяет эксперт-цитолог.

7.1. Установление наличия крови

Первым этапом экспертизы следов крови на вещественных доказательствах является установление ее наличия.

Выбор первоначальной методики определяется визуальной оценкой цвета и насыщенности исследуемого объекта. Затем (при отрицательном результате) применяют другие методы – последовательно, по мере возрастания их чувствительности.

Выявление следов, похожих на кровь, первоначально производят визуально при естественном свете, ярком солнечном или искусственном освещении с использованием лупы или без нее, осторожным поскобливанием острым предметом поверхности следа, особенно если он имеет темный цвет.

Ориентировочные методы установления наличия крови можно разделить на две группы:

- 1) исследование в ультрафиолетовых лучах;
- 2) химические реакции.

Исследование в ультрафиолетовых лучах. При проведении данного исследования пятна крови имеют характерный темно-коричневый цвет и бархатистый вид. В то же время, необходимо учитывать, что и некоторые другие вещества, например, ржавчина, могут при исследовании в ультрафиолетовых лучах иметь такой же цвет и вид. Кроме того, исследуемые пятна могут иметь яркий оранжево-красный цвет в случае превращения красящего вещества крови в гематопорфирин. Исследование в ультрафиолетовых лучах может быть признано целесообразным при исследовании пятен, подвергшихся замыванию.

Химические реакции. Применяются две группы реакций: 1) реакции на каталазу и пероксидазу крови и 2) реакции хемолюминесценции.

В основе пробы с перекисью водорода лежит способность крови разлагать перекись водорода с образованием воды и свободного кислорода.

Для проведения пробы применяют 3% раствор перекиси водорода. Положительный результат реакции – появление пены белого цвета или пузырьков кислорода. Недостаток реакции: не получается с пятнами крови значительной давности образования.

В основе проб на пероксидазные свойства крови лежит способность крови или содержащейся в ней пероксидазы переносить кислород от одного вещества к другому. В настоящее время наиболее часто применяемой методикой этой группы является реакция с бензидином. Для ее проведения на марлю наносят смесь 1% спиртового раствора основного бензидина с 5% раствором перекиси водорода. В случае присутствия крови реактив на марле в месте контакта с пятном приобретает синюю окраску.

Реакция хемолюминесценции проводится в затемненном помещении, поскольку основана на возникновении свечения, которое возбуждается энергией, освобождающейся при химической реакции. Для ее проведения применяют люминолгидразид триаминофталевой кислоты. Сначала готовят раствор (1 г. люминола, 0,5 г. натрия гидрокарбоната на 1 л дистиллированной воды). Перед употреблением к этому раствору добавляют пергидроль из расчета 10 мл на 1 л раствора. Несколько капель раствора наносят на подозрительное пятно. При положительном результате реакции наблюдается вспышка голубого цвета и образуется белая пена.

Доказательные методы установления наличия крови основываются на обнаружении гемоглобина и его производных. В настоящее время для установления наличия крови применяются следующие доказательные методы: тонкослойная хроматография, микроспектроскопия, флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия, иммунохроматографический анализ. Перечисленные методы выявляются методами выбора и любой из них может быть использован экспертом в работе, однако при этом следует учитывать чувствительность каждого метода. Для вывода о присутствии крови может быть использован любой из перечисленных методов, давший после его применения положительный результат, а для вывода о том, что кровь не обнаружена – последовательное применение разных методов по нарастанию их чувствительности.

Принцип метода хроматографии состоит в следующем. На бумагу или стеклянную пластинку со слоем сорбента помещают вещество, подлежащее исследованию. Место нанесения его называется линией старта. По мере

продвижения жидкости происходит разделение веществ, входящих в состав исследуемого объекта. Границу продвижения жидкости (линию фронта) отмечают. Бумагу или пластину высушивают и проявляют реактивом, окрашивающим искомое вещество. Важную идентификационную роль играет величина R_f , т.е. отношение расстояния, пройденное исследуемым веществом, к расстоянию, пройденному растворителем.

Методика проведения тонкослойной хроматографии на силуфоле. В чашку Петри диаметром 10 см помещают силуфолевую пластинку размером 5x7,5 см. Один из торцевых концов на расстоянии приблизительно 1 см от конца изогнут под прямым углом. Другой, противоположный торцевому конец опирается на подставку из фольги. На дно чашки наливают универсальный растворитель. Чашки закрывают, проводят разделение. Проявитель: 1% раствор бензидина в этаноле с ледяной уксусной кислотой (10:1) и 3% перекись водорода. Контроль - 1% раствор крови.

Техника проведения:

1. Подготовка пробы. Объект экстрагируют физиологическим раствором или дистиллированной водой. *Примечание: вытяжки на дистиллированной воде нельзя использовать для реакции кольцепреципитации. Вытяжки должны содержать кровь в разведении не менее 1:1000, тогда ее остатки можно использовать для установления видовой принадлежности.*

2. Подготовка силуфолевой пластинки. Приготовление дорожек шириной 1 см препаровальной иглой.

3. Нанесение пробы на сорбент. У линии старта в центре дорожки прикосновением тонкого капилляра наносят пробы 1 или несколько раз, просушивают при комнатной температуре.

4. Разделение. На дно чашки Петри наливают универсальный растворитель 3-5-7 мл. Состав: бутанол, ледяная уксусная кислота, вода в соотношении 4:1:2; 4:1:5.

5. В чашку Петри помещают пластину. Разделение в течение 10-15 минут. Фронт растворителя должен располагаться у противоположного края пластины. Пластины высушить при комнатной температуре. Прогревают в течение 15 минут при температуре 100°C, в течение 10 минут при температуре 110°C, в течение 5 минут при температуре 115°C.

6. Проявление. Сначала пластину обрабатывают раствором бензидина и наблюдают изменение цвета. Затем обрабатывают H_2O_2 – вблизи линии финиша наблюдают синее окрашивание.

7. Учет результатов. Кровь считается обнаруженной, если значение R_f проб совпадает с показателем заведомой крови ($R_f = 0,83$).

Показания к применению тонкослойной хроматографии:

1) Исследование замытых пятен, расположенных на обширных участках предмета-носителя (для этого готовят концентрированную вытяжку из многих участков);

2) Исследование невидимых невооруженным глазом, слабовыраженных поверхностных пятен на негигроскопичных материалах (для этого увлажненной нитью марли делают смывы с большой поверхности);

3) Как элемент в комплексном исследовании малых следов (для экономии пятна);

4) Установление примеси крови в следах спермы.

Гнилостно измененные пятна, подозрительные на содержание крови, а также имеющие большую давность образования, исследовать методом тонкослойной хроматографии нецелесообразно.

Для установления присутствия крови в пятнах *микроспектральным методом* с помощью спектральных насадок; на предварительном этапе исследования необходимо искусственно получить продукты далеко зашедшего процесса разрушения гемоглобина (контрольные дериваты): гемохромоген или гематопорфирин. Для получения гемохромогена к контрольному образцу крови и к ниточке из исследуемого пятна добавляют 33% раствор NaOH и восстановитель (многосернистый аммоний или сульфид аммония). Для получения гематопорфирина к указанным объектам добавляют концентрированную серную кислоту. Данное исследование основано на способности раствора гемоглобина и его производных избирательно поглощать лучи волн определенной длины и образовывать в спектре черные полосы. Каждое производное гемоглобина обладает своим спектром поглощения. Спектр гемохромогена имеет две полосы поглощения в желто-зеленой части спектра, которые по сравнению со спектром оксигемоглобина смещены чуть вправо в зеленую часть. Гематопорфирин также имеет две полосы поглощения, но они смещены по сравнению со спектром оксигемоглобина влево в красную часть. Поскольку спектр гемохромогена

более чувствителен, чем спектр гематопорфирина, в практической работе ему отдают предпочтение. В результате проведения микроспектрального исследования пятен, подозрительных на кровь, получают спектр поглощения деривата (гемохромогена или гематопорфирина) в исследуемом объекте, который нужно идентифицировать. После сравнения полученного спектра с контрольным, наличие крови является доказанным.

Помимо установления наличия крови по спектру гематопорфирина микроспектральным методом, в судебной биологии используются флюоресцентные методики: флюоресцентная микроскопия гематопорфирина и спектроскопическое исследование флюоресценции гематопорфирина. Положительным результатом флюоресцентной микроскопии является обнаружение флюоресцирующих оранжево-красных глыбок гематопорфирина. Исследуемые объекты предварительно обрабатываются концентрированной серной кислотой. Данная методика обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять следы крови даже в случае разрушения гема, в связи с чем может быть использована для поиска замкнутых, невидимых невооруженным глазом следов крови, а также для контроля достоверности отрицательных результатов большинства других методов исследования на наличие крови. Для обнаружения спектра флюоресценции гематопорфирина в поле зрения люминесцентного микроскопа находят подходящую светящуюся глыбку, на тубусе микроскопа укрепляют микроспектроскоп и, соблюдая правила работы с ним, получают указанный спектр, который имеет вид широкой оранжево-красной полосы (по шкале между 590 нм и 650 нм), при этом сравнивая его с контрольным спектром. При совпадении контрольного и исследуемого спектра наличие крови следует считать доказанным.

Для доказательного установления наличия крови могут быть использованы методы, основанные на явлении биолюминесценции: люминесцентный гемотест (Гем-Т) и спектрофлуориметрию (СФМ). В основе метода люминесцентного гемотеста лежит способность гемоглобина инициировать фотохимическую реакцию окисления люминола. Интенсивность возникающей хемилюминесценции в течение 10 секунд (светосумма) регистрируется с помощью лабораторного хемолуминометра. Метод позволяет быстро определить микроколичества гемоглобина, не различимых невооруженным глазом. При проведении спектрофлуориметрии

регистрируют и сравнивают спектры флюоресценции исследуемых и контрольного объектов (заведомой крови) на микроскопеспектрофлюориметре, сопряженном с компьютером. О наличии крови судят по совпадению длин волн и максимумов флюоресценции гематопорфирина в сравниваемых препаратах [59, 60].

В настоящее время для определения наличия крови широко используются иммунохроматографический анализ (иммунохроматографические тесты), которые позволяют одновременно обнаружить кровь (гемоглобин) в исследуемом объекте и доказать ее происхождение ее от человека.

Сравнительные исследования показали, что иммунохроматографические тесты на гемоглобин человека обладают достаточно высокой чувствительностью, они более чем в 8000 раз чувствительнее метода тонкослойной хроматографии, в 4000 раз метода спектрофлюориметрии и в 256 раз чувствительнее люминесцентного гемотеста.

7.2. Установление видовой принадлежности крови

Вторым «классическим» этапом экспертизы следов крови на вещественных доказательствах является установление ее видовой принадлежности. После открытия видовой специфичности преципитинов, полученных иммунизацией животных сывороточными белками, реакция преципитации была использована в судебной медицине для определения видовой принадлежности крови в пятнах [88, 104]. До настоящего времени реакция преципитации является основным методом определения видовой принадлежности крови в пятнах.

Для установления видовой принадлежности пятен крови применяют следующие иммунологические методы: реакцию кольцепреципитации (РКП), реакцию преципитации в агаре (РПА), встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ), ВИЭФ на ацетатцеллюлозной пленке (АЦП), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммунохроматографический анализ (ИХА), твердофазный количественный иммуноферментный анализ (ИФА) по IgG человека, цитологический метод (по Y-хроматину).

Техника РКП. Реакцию проводят в пробирках с коническим концом (пробирки Уленгута). В судебно-медицинской практике распространение

получил вариант реакции, при котором на дно пробирки помещают преципитирующую сыворотку, а на ее поверхность наслаивают антиген (вытяжку из пятна), не допуская смешивания. Реакция получила свое название в связи с тем, что при взаимодействии соответствующих антител (АТ) и антигена (АГ) образуется кольцо (точнее диск преципитата) на границе соприкосновения реагентов. Реакция хорошо видна и протекает в широкой зоне количественных соотношений АГ и АТ, при которых наступает образование преципитата [80, 81, 83].

Методика исследования включает четыре основных этапа:

1 этап. *Определение рабочих параметров преципитирующих сывороток.*

Для проведения реакции используют не менее трех видов сывороток: преципитирующую белок человека и двух животных (исходя из обстоятельств дела). Требования, предъявляемые к сывороткам: прозрачность, стерильность, специфичность, серологическая активность. Производят определение активности, чувствительности, титра преципитирующих сывороток. Активность преципитирующих сывороток выражена их титром. Это максимальное разведение гомологичного АГ, с которым образуется преципитат к определенному сроку наблюдения. С каждым разведением РКП отмечают время и делают вывод о титре. Сыворотки должны давать реакцию с гомологичным АГ в разведении 1:1000 в течение 1-5 минут, с разведением 1:5000 к 10 минутам, с разведением АГ 1:10000 – к 15 минутам. Сыворотки, удовлетворяющие этим требованиям, являются пригодными для работы. Затем устанавливают специфичность преципитирующих сывороток. Суть заключается в отсутствии перекрестных реакций со всеми чужеродными АГ, взятыми в разведении 1:1000, в течение часа. Сыворотка не должна в течение 1 часа реагировать с сыворотками других животных. Готовят разведение 1:1000 со всеми чужеродными АГ и наблюдают 1 час. Титр определяют перед каждым исследованием. Специфичность проверяют только один раз при поступлении.

2 этап. *Приготовление исследуемого материала.* Готовят вытяжки из пятен и предмета-носителя, взятого в непосредственной близости от пятна – на расстоянии 3-4 мм, размеры вырезки увеличивают при малой насыщенности. Существуют определенные требования к вытяжке из пятен. Первое требование – вытяжки должны быть прозрачными и светлыми. Если вытяжки мутные, то их просветляют микрофилтрацией. Второе требование –

содержание белка в вытяжке должно быть строго определенным, должно укладываться в интервал между показателями специфичности и титра используемых сывороток. Вытяжка не должна быть более концентрированной, чем контрольные гетерологичные сыворотки от животных не более 1:1000. Вместе с тем, вытяжка не может быть более разведенной, чем гомологичная (нормальная) сыворотка, которая указала титр (предельную чувствительность) данной сыворотки. Для этого часть концентрированной вытяжки разводят до желтого цвета, проверяют содержание белка пробой Геллера, затем разводят до нормальной концентрации. Вытяжка обычно имеет соломенно-желтый цвет.

3 этап. Постановка основного и контрольного опыта. Количество рядов пробирок Уленгута по числу преципитирующих сывороток – минимум 3 (основная + 2 контрольные). Последний ряд – вытяжки из предметоносителей. Контролем реакции в целом служат: а) исследование вытяжек из пятен с двумя другими сыворотками б) исследование вытяжек из предметоносителей с сывороткой, которая дала реакцию с вытяжками из пятен. Все преципитирующие сыворотки проверяют с нативными сыворотками-антигенами в разведении 1:1000, если продолжительное время не проверяли их титр или если открыли новую ампулу.

4 этап. Оценка результатов РКП. Положительный результат – наличие белесоватого диска преципитации на границе двух сред.

Мутность вытяжек из пятен крови, препятствует проведению реакции преципитации в жидкой среде. Для исследования сильно загрязненных объектов, вытяжки из которых получаются мутными, применяют РПА. Кроме этого, РПА применяется при неспецифическом влиянии предмета-носителя в РКП, малом количестве вытяжки или сыворотки. К несомненным достоинствам РПА можно отнести устойчивость к влиянию предмета-носителя и возможность объективной регистрации результата (фотографирование). Недостатками РПА считают ее относительно низкую чувствительность (в 2 раза менее чувствительна, чем РКП) и длительные сроки наблюдения (от нескольких часов до нескольких суток под контролем специфичности реакции).

В основе РПА лежит принцип встречной (двумерной) диффузии. РПА можно проводить на предметных стеклах или в чашках Петри. Рабочим разведением служит 1% раствор агара. Специальным металлическим

пробойником в агаре делают отверстия (от 3 до 6). Расстояние между центральным отверстием и отверстиями по периферии составляет 3-5 мм [47, 49, 98].

Методика установления видовой принадлежности крови при помощи РПА включает 4 этапа.

1 этап. *Проверка титра и специфичности преципитирующих сывороток.* Для определения титра в центральную лунку розетки помещают каплю диагностической сыворотки, преципитирующей, белок человека, а вокруг разведение соответствующего антигена (разведение в зависимости от титра сыворотки в РКП) – нативную сыворотку крови человека, учитывая, что ее титр ниже от 2 до 10 раз. В связи с чем, при выборе разведения АГ нужно разведение сделать таким, чтобы конечное разведение присутствовало. *Пример расчета: допустим, титр сыворотки в РКП 1:5000, при падении в 2 раза 1:2500, при падении в 10 раз 1:500. Два ряда разведения АГ. 1 ряд 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600. 2 ряд 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000.* Титр зависит от метода. Специфичность проверяют подобным образом. В центральную лунку, как и при определении титра, помещают каплю сыворотки, преципитирующей белок человека, а в периферические лунки – все чужеродные (гетерологичные) АГ (неразведенные) или взятые в минимальном разведении – 1:10 – сыворотки крови животных.

2 этап. *Приготовление объекта.* Если сыворотки специфичны, то вытяжки не разводят, вырезки приравниваются к цельным антигенам. К цельному антигену добавляют одну каплю физиологического раствора. Пробу Геллера перед РПА не выполняют.

3 этап. *Постановка основного и контрольного опыта.* Вытяжка из пятна и предмета-носителя. Сразу ставят все пятна и контроли. Применяют один из вариантов: а) в центре розеток преципитирующая сыворотка, а вокруг вытяжки из пятен и предмета-носителя; б) в центре розетки исследуемый материал, а вокруг сыворотка. Вытяжку вносят в центр розетки, а сыворотки - по периферии.

4 этап. *Учет результатов.* Регистрация полос преципитации. Срок наблюдения от нескольких часов до суток. Продление учета под контролем специфичности повышает возможности реакции.

Методика встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ). ВИЭФ используется для установления: видовой принадлежности крови на

вещественных доказательствах, включая объекты малой величины; видовой принадлежности мышц; видовой принадлежности костей; при исследовании мутных вытяжек; при плохой растворимости белков исследуемого объекта; при неспецифических явлениях в РКП [47, 96, 98]. Принцип метода заключается в следующем. При электрофорезе иммунных сывороток в геле глобулиновые фракции, содержащие АТ, вследствие эндосмоса перемещаются от анода к катоду, а большинство АГ (за исключением тех, которые имеют только глобулиновую природу) – от катода к аноду. Таким образом, двигаясь навстречу друг другу, они образуют преципитат. Чувствительность реакции связана с выраженностью электроэндоосмоса и сорбционными свойствами агара. Чувствительность ВИЭФ ниже, чем РКП и приближается к чувствительности РПА. Вместе с тем, конечный результат ВИЭФ получают гораздо быстрее, чем результат РПА.

Техника ВИЭФ.

1. Приготовление буферных растворов. Может быть использован веронал-мединаловый буфер (предложено несколько вариантов рецептур), боратный буфер, фосфатный буфер, трисовый буфер.

2. Приготовление пластин с агаром. Агар помещают на пластины, по трафарету намечают отверстия и вынимают цилиндры. Диаметр лунок в зависимости от экспертных задач. Стандартные размеры 5-10 мм.

3. Внесение реагентов. В вертикальные анодные ряды помещают диагностические преципитирующие сыворотки, в катодные ряды – вытяжки из пятен, из контрольных участков и заведомые антигены (животных).

4. Проведение электрофореза. Боковые стороны агаровой пластины соединяют + и -. Процесс стабилизируют по току. Длительность электрофореза 30-40 мин.

5. Учет результатов: регистрация полос преципитации.

Методика ВИЭФ.

1 этап. Проверка титра и специфичности сывороток.

2 этап. Приготовление объектов исследования.

3 этап. Постановка основного и контрольного опыта. Применяют сыворотки, преципитирующие белок человека двух животных, ставят контроль с пятном. Используют заведомые антигены в разведении 1:1000.

4 этап. Учет результатов реакции. При положительном результате реакции между исследуемой кровью и соответствующей преципитирующей сывороткой образуются полосы преципитата [82].

ВИЭФ на АЦП. В практике судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств этот метод может быть использован при определении видовой специфичности белков крови и выделений, в особенности при малом количестве исследуемого материала. Практически только этим методом в силу его высокой чувствительности возможно установить видовую принадлежность мочи (другие методики для этой работы не пригодны), а также вид белка в подвергавшихся тщательному уничтожению в следах крови.

АЦП имеет ряд преимуществ по сравнению с другими носителями (агаром, поликрилом). В частности, АЦП всегда готова к использованию, отпадает необходимость в подготовительных мероприятиях, что значительно сокращает время исследований. Пленка отличается однородностью структуры, отсутствием абсорбции белка, стабильностью физико-химических свойств. Для исследования на АЦП требуется небольшое количество материала (1-2 мкл). Результат исследования можно длительно хранить и использовать в качестве иллюстративного материала. Положительным результатом ВИЭФ на АЦП считают образование между стартовыми канавками, в которые помещены вытяжка из исследуемого объекта и преципитирующая сыворотка, четко различимых одного или нескольких преципитинов [50].

Чувствительность методики установления видовой принадлежности крови с помощью РИФ в количественной модификации в 1000 раз больше, чем у ВИЭФ как в агаре, так и на АЦП, однако объективной трудностью применения этого метода в настоящее время является прекращение производства в России флюоресцирующей сыворотки [59].

В случае отрицательных результатов содержание белка в вытяжках из исследуемых объектов проверяют пробой Геллера. Капиллярный конец пастеровской пипетки в вертикальном положении опускают в пробирку с вытяжкой и набирают небольшое количество вытяжки. Пипетку вынимают из пробирки, конец осторожно вытирают, после чего капиллярный конец пипетки почти в горизонтальном положении опускают в концентрированную азотную кислоту, налитую на часовое стекло. Пипетку вынимают из кислоты.

На месте соприкосновения вытяжки и кислоты при положительном результате реакции – образуется осадок белка вытяжки.

В зарубежных странах для установления видовой принадлежности крови и других биологических объектов по IgG достаточно широко используется метод количественного ИФА [90, 102]. В России была разработана усовершенствованная технология установления видовой принадлежности биологических объектов по IgG человека с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием отечественных тест-наборов реагентов для иммуноферментного определения общего IgG (иммуноглобулина G) человека [61, 65]. Данный метод предназначен для определения IgG-общего. Общий принцип методов заключается в образовании специфического иммунного комплекса: иммобилизованных IgG – АТ и моноклональных IgG – АТ, меченых пероксидазой. Исследуемые IgG в результате анализа оказываются как бы «зажатыми» между молекулами иммобилизованных и меченых АТ. Данный комплекс выявляется посредством окраски с помощью раствора тетраметилбензидина, после чего в лунки полистирольного планшета вносят стоп-реагент. Регистрация результатов реакции осуществляется фотометрически на регистрирующем приборе при длине волны 450 нм с введением результатов в компьютер. Преимущества этого метода перед широко распространенными в настоящее время в судебно-медицинской практике методиками ВИЭФ, РКП и РИФ, применяемыми для установления видовой принадлежности биологических объектов, состоят в большей чувствительности по сравнению с ВИЭФ и РКП, а также в большей производительности и доказательности по сравнению с РИФ. Высокая чувствительность данного метода определяет также целесообразность ее применения при исследовании замытых следов биологического происхождения, биологических следов с большим сроком давности образования, исследованием микрофрагментов мышечной и костной ткани.

7.3. Установление групповой принадлежности крови по системе АВ0

Третьим этапом экспертизы следов крови на вещественных доказательствах является установление ее групповой принадлежности. Изосерологическая система АВ0 занимает ведущее место при экспертном исследовании разнообразных объектов биологического происхождения.

Исследование жидкой крови. Для определения группы жидкой крови в судебной медицине применяют двойной пробирочный метод по Шиффу, который является вариантом реакции гемагглютинации. Определение групповой принадлежности производится по антигенам и агглютинином, что имеет преимущества перед вариантом ее определения на плоскости, поскольку позволяет получить полную формулу крови и выявить ее слабые свойства. В каждую пробирку помещают ингредиенты в определенных соотношениях: 2 капли сыворотки и 4 капли 1% взвеси эритроцитов. Для исследования одного образца крови используют 4 пробирки, в две из которых помещают стандартные сыворотки α и β , в остальные две – сыворотку исследуемой крови (по 2 капли). К стандартным сывороткам α и β добавляют 1% взвесь эритроцитов исследуемой крови, к сыворотке исследуемой крови – 1% взвесь стандартных эритроцитов А и В – по 4 капли. Смесь центрифугируют в течение 4 мин при 1500 об./минуту, после чего пробирки встряхивают и учитывают результаты реакции вначале макроскопически, а при отсутствии видимой невооруженным глазом агглютинации – микроскопически.

Исследование пятен крови. Определение групп крови системы АВ0 в следах крови основано на выявлении соответствующих антигенов и агглютининов. Антигены системы АВ0 при отсутствии гниения или воздействия на пятно сильных разрушающих факторов (ультрафиолетовые лучи, высокая температура и т. п.) могут сохраняться в следах крови десятки лет. α - и β -агглютинины в крови разных людей содержатся в различном количестве, более подвержены внешним воздействиям и сохраняются в пятнах от нескольких дней до нескольких месяцев.

Для установления групповой принадлежности крови в пятнах на вещественных доказательствах применяют: реакцию абсорбции-элюции (РАЭ), количественную реакцию абсорбции агглютининов (КРА), реакцию смешанной агглютинации (РСА), различные методы выявления агглютининов.

Выявление агглютининов. Для выявления агглютининов применяют: метод покровного стекла по Ляттесу, метод Марцинковского, метод накопления, метод Серопяна.

Наиболее часто в экспертной практике для выявления α - и β -агглютининов в пятнах крови используют метод покровного стекла по Ляттесу. Из исследуемого пятна крови вырезают три кусочка размером

0,2×0,3 см. При наличии крови на невсасывающей поверхности для реакции применяют ее соскобы в виде сухих корочек. Материал пятна помещают на предметные стекла и к ним добавляют 0,1% взвесь стандартных эритроцитов А, В и 0. Препараты устанавливают во влажные камеры и периодически в течение 2-4 часов (до начала подсыхания эритроцитарной взвеси) производят их микроскопирование при легком надавливании покровных стекол препаровальной иглой для отделения агглютинатов от скоплений эритроцитов, которые при надавливании покровного стекла распадаются на отдельные элементы. Положительным результатом реакции считают агглютинацию эритроцитов А или В материалом пятна крови при отсутствии агглютинации с эритроцитами 0. Отрицательный результат реакции может быть получен как вследствие разрушения агглютининов в пятне крови, так и при исследовании крови группы АВ. Учитывая неравномерное распределение агглютининов в пятне крови, рекомендуется использовать различные участки пятна. Выявление даже одного агглютинина позволяет иногда исключить принадлежность крови конкретному лицу. Например, выявление в пятне α-агглютинина исключает возможность происхождения крови от лиц с группами А и АВ. Особенно тщательное исследование агглютининов необходимо при выявлении в пятне крови двух АГ – А и В, поскольку оно может быть образовано как кровью группы АВ, так и смешанной кровью разных групп. Обнаружение одного или двух агглютининов свидетельствует в данном случае о наличии в пятне смешанной крови, а не крови группы АВ.

Если жидкость грязная, мутная, со взвешенными частицами, то ее концентрируют и высушивают, извлекая на полоску фильтровальной бумаги (по Марцинковскому). Верхняя часть фитиля при наличии крови будет едва окрашена в желтовато-бурый цвет, ее срезают и исследуют, как вырезку из пятна крови.

Видовые и групповые факторы крови водорастворимы, поэтому они также будут передвигаться по бумажному фитилю, поэтому средняя и нижняя части фитиля могут быть использованы для установления видовой и групповой принадлежности крови.

РАЭ, предназначенная для определения групп изосерологической системы АВ0 в пятнах крови малой величины, пополнила арсенал методов экспертов бюро судебно-медицинской экспертизы в начале 1970-х годов [42].

Удобство применения РАЭ определяется ее высокой чувствительностью, что позволяет исследовать пятна малой величины и выявлять слабые антигены при отсутствии влияния предмета-носителя. Вместе с тем, РАЭ, в отличие от КРА, является качественной реакцией и не позволяет судить о силе выявляемых АГ, в случае ее применения существует возможность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. В этой связи в некоторых случаях требуется проведение повторных исследований для подтверждения результатов первой реакции [29, 30].

Принцип реакции основан на возможности искусственного температурного разрушения (диссоциации) образовавшегося в процессе абсорбции комплекса антиген – антитело и элюирования абсорбированных антител в окружающую среду, в которой они вступают во взаимодействие с соответствующими тест-эритроцитами, играющими роль индикаторов элюированных антител. В РАЭ участвуют три различных иммунологических компонента: АГ пятна; АГ стандартной сыворотки; АГ стандартных эритроцитов. АГ стандартной сыворотки на разных этапах данной реакции взаимодействуют с различными АГ: сначала с АГ пятна, а затем с АГ тест-эритроцитов.

Для исследования из пятна крови и контрольных участков предмета-носителя вырезают отдельные ниточки длиной 0,5-0,6 см; если пятно крови располагается на непитающей поверхности, то его переводят на смоченную дистиллированной водой марлю и подсушивают. Так же получают смыв и с контрольного участка предмета без следов крови. Исследования начинают с обязательной обработки ниточек со следами крови и из участков предмета-носителя метиловым (этиловым) спиртом в избыточном количестве, который фиксирует кровь на ниточках материала. Обычно фиксацию продолжают в течение 15-20 минут до полного испарения спирта. Некоторые авторы для устранения собственных агглютининов из исследуемого пятна крови рекомендуют увеличивать срок фиксирования метанолом до 25-30 минут.

После фиксации с помощью препаровальных игл ниточки осторожно разволокняют, стараясь не разрушить полностью их целостность. Для проведения абсорбции в РАЭ обычно используют α - и β -изосыворотки с высоким титром от 1:128 до 1:512. К ниточкам из предметов-носителей следов

крови, помещенных в соответствующие пробирки, добавляют по 1-2 капли каждой сыворотки (0,05 мл на каждую ниточку), пробирки закрывают ватой и оставляют для абсорбции.

Условия абсорбции (ее продолжительность и температурный режим) в зависимости от характера исследуемого пятна крови (его выраженности, давности образования и т. д.), а также наличия групповых АГ в образцах крови проходящих по делу лиц могут значительно варьировать. Общепринято, что интенсивно выраженные АГ с высокой антигенной активностью хорошо выявляются как при длительной абсорбции (18-20 часов) в условиях холодильника (при температуре +4-6°C), так и при непродолжительной абсорбции (2-3 часа) при комнатной температуре (18-20°C). Многие авторы рекомендуют выявлять слабовыраженные антигены системы АВ0 в условиях так называемой комбинированной абсорбции, при которой сначала материал абсорбируют в течение 1 часа при температуре +37°C, затем – 3-4 часа при комнатной температуре и затем – в течение суток при температуре + 4-6°C.

После абсорбции материал освобождают от сыворотки путем промокания фильтровальной бумагой и приступают к отмыванию избытка неабсорбированных АГ. Его проводят либо в лунках специальных пластинок, либо в широких укороченных пробирках охлажденным (ледяным) изотоническим раствором натрия хлорида. Каждый объект отмывают в ряду лунок или пробирок не менее 3-4 раз, причем число и интенсивность отмываний зависит от титра использованных для абсорбции сывороток. Каждую нитку с кровью или нитку предмета-носителя после промывания в лунке или пробирке переносят пинцетом на чистый участок фильтровальной бумаги для просушивания и затем помещают в следующую лунку или пробирку. Необходимо при промывании ниток с кровью и контрольных ниток соблюдать абсолютно одинаковые условия (число отмываний, их интенсивность, объем изотонического раствора и т. д.).

После удаления несвязанных АГ проводят пробу на чистоту отмывания материала. Для этого к каждому исследуемому объекту добавляют две капли изотонического раствора натрия хлорида, пастеровской пипеткой несколько раз отсасывают и вновь наносят их на материал и, наконец, помещают в агглютинационную пробирку, в которую добавляют одну каплю 1% взвеси стандартных эритроцитов. Пробирки центрифугируют в течение 4 минут при 1500-2000 об./минуту, встряхивают и устанавливают агглютинацию или

отсутствие ее под микроскопом. Если агглютинация эритроцитов не наблюдается как в материале пятна крови, так и в материале предмета-носителя, то переходят к следующей фазе РАЭ – элюции абсорбированных АТ. Если же проба на чистоту отмывания дала положительный результат (наличие даже слабовыраженной агглютинации добавленных стандартных эритроцитов), то приступают к дополнительному отмыванию до полного устранения избытка непрореагировавших АТ.

Элюцию абсорбированных АТ приводят обычно термическим путем (некоторые авторы применяют химическое воздействие, вызывающее элюцию антител из комплекса АГ – АТ). При термической элюции исследуемый материал помещают в термостат при температуре 56°C на 10-25 минут, причем элюцию проводят либо в изотонический раствор натрия хлорида, либо во взвесь стандартных эритроцитов групп А_β и В_α.

Элюцию в изотонический раствор обычно осуществляют на предметных стеклах (можно и в пробирках). Для этого ниточки материала заливают двумя каплями неохлажденного изотонического раствора натрия хлорида. Предметные стекла, не накрывая покровными стеклами, помещают во влажные камеры и ставят на 20-25 мин в термостат, предварительно нагретый до указанной температуры. После этого к препаратам добавляют по одной капле 0,5% взвеси соответствующих стандартных эритроцитов групп А_β или В_α, препараты оставляют во влажных камерах при комнатной температуре на 2-3 часа. Затем препараты микроскопируют и при наличии агглютинации эритроцитов к ним добавляют 1-2 капли изотонического раствора натрия хлорида, накрывают покровными стеклами и учитывают результаты агглютинации. Препараты, в которых через 2-3 часа агглютинации не отмечается, сохраняют во влажных камерах и периодически просматривают под микроскопом. Окончательный учет результатов проводят спустя 5-6 часов после добавления изотонического раствора натрия хлорида, накрытия препаратов покровными стеклами и их микроскопирования.

При исследовании в пробирках изотонический раствор натрия хлорида после проведения элюции отсасывают из препаратов и переносят в другие агглютинационные пробирки, в которые добавляют одну каплю 0,5% взвеси стандартных эритроцитов групп крови А_β или В_α. Пробирки центрифугируют 4 минуты при 1500-2000 об./минуту, встряхивают, содержимое выливают на

предметные стекла, накрывают покровными стеклами и производят микроскопический учет результатов.

Элюцию во взвесь эритроцитов, так же, как и в изотонический раствор натрия хлорида, можно проводить как в пробирках, так и на предметных стеклах. Техника элюирования такая же, как и в изотонический раствор, однако вместо последнего используют 0,2-0,3% взвесь соответствующих стандартных эритроцитов групп А β или В α .

Для элюирования абсорбированных АТ в РАЭ используют температурное воздействие для диссоциации образовавшегося комплекса АГ – АТ. Если элюат из пятна крови агглютинирует тест-эритроциты А или В, а в препаратах контрольных участков предметов-носителей агглютинация эритроцитов отсутствует, то можно сделать вывод о наличии в пятне крови АГ, соответствующей антигенной характеристике агглютинированных тест-эритроцитов. Если, например, в препаратах из пятна крови наблюдается агглютинация тест-эритроцитов В и отсутствует агглютинация тест-эритроцитов А и, кроме того, во всех контрольных препаратах не отмечается агглютинации эритроцитов А и В, то можно сделать вывод о наличии в исследуемом пятне крови АГ В и отсутствии АГ А. Если же наблюдается агглютинация тест-эритроцитов групп А и В, то это свидетельствует о присутствии в пятне АГ А и В.

Очень часто выявление АГ системы АВ0 в следах крови при помощи РАЭ бывает затруднительным в результате неблагоприятного влияния на ход реакции различного рода загрязнений предмета-носителя. В таких случаях прибегают к различным видоизменениям этой реакции:

1) использованию тех же сывороток, которые добавляют к объектам на стадии абсорбции, но в большем объеме;

2) проведению повторных элюций антител из одних и тех же объектов; в таких случаях из объекта исследования (пятна крови) могут вновь элюировать АТ которые вызовут агглютинацию соответствующих тест-эритроцитов, а из контрольных участков предмета-носителя такой элюции может уже не наблюдаться. При влиянии загрязнений предмета-носителя на ход РАЭ, элюцию АТ обычно проводят в изотонический раствор натрия хлорида, а не во взвесь стандартных тест-эритроцитов;

3) проведению повторных абсорбций АТ с последующим их элюированием, с использованием сывороток как с первоначальным, так и с более высоким титром;

4) увеличению числа отмываний материала пятна крови и контрольного предмета-носителя после фазы абсорбции для удаления избытка несвязавшихся АТ;

5) проведению абсорбции в сокращенные сроки при различных температурных режимах; в таких случаях сокращенного времени бывает достаточно для абсорбции антител антигенами пятна крови и недостаточно для неспецифического связывания АТ;

б) предварительному приготовлению из пятен крови и контрольных участков предмета-носителя вытяжек на дистиллированной воде или смывов с них, которые высушивают на марле и используют при постановке РАЭ.

С помощью РАЭ в следах крови выявляют также и антиген Н. С этой целью используют моноклональные АТ анти-Н. Методика проведения РАЭ с такими реагентами аналогична применяемой для выявления в следах крови АГ А и В.

КРА не потеряла своего значения, несмотря на то обстоятельство, что к настоящему времени РАЭ стала наиболее часто применяемой реакцией. КРА имеет свои показания к применению и преимущества, позволяющие повысить достоверность установления групповой принадлежности пятен крови на вещественных доказательствах в затруднительных случаях. КРА можно использовать как дополнение РАЭ при выраженном влиянии предмета носителя на диагностическую сыворотку, при наличии высокой вероятности возникновения блокады АТ в фазе элюции, а также для сравнения абсорбционной способности крови в исследуемом пятне и в образце, представленном на исследование [55].

Количественная реакция абсорбции принципиально отличается от простой реакции абсорбции агглютининов тем, что обнаружение искомого антигена в КРА возможно как при полном связывании антител антигеном пятна, так и при частичном, тогда как для выявления АГ в простой реакции абсорбции агглютининов связывание АТ должно было быть обязательно полным. Проверка титра абсорбированной сыворотки и сравнение ее с исходным позволяет сделать вывод об обнаружении АГ в пятне, когда количество АТ (титр) снизилось или полностью, или частично.

Снижение титра абсорбированной сыворотки принято выражать в «ступенях поглощения». Степень поглощения – это одно разведение абсорбированной сыворотки, в котором агглютинация соответствующих эритроцитов отсутствует по сравнению с аналогичным разведением исходной сыворотки. Учет результатов КРА начинают с конечных разведений, точнее с того разведения, в котором агглютинация эритроцитов отсутствует, обозначая его как «-» а, близлежащее к нему с незначительной агглютинацией, обозначая как «±».

Техника проведения КРА. Согласно классической методике КРА, титрование проводят в пробирках. Для этого сначала в пробирках производят кратные разведения изосывороток на физиологическом растворе до конечного разведения 1:64. Затем к 2 каплям каждого разведения сыворотки нужно прибавить по 1 капле 1% взвеси соответствующих стандартных эритроцитов. Пробирки с реагентами центрифугируют 4 минуты при 1,5 тыс. об./минуту. Образовавшийся в пробирках осадок разбивают ударами о ладонь и учитывают результат микроскопически. Такой метод титрования можно использовать как для подбора титра сывороток, так и для проведения основного опыта. Наиболее оптимальным методом для подбора титра сывороток и работы с пятнами методом КРА является титрование с последующим отстаиванием в платах (в течение 1,5-2 часов) или качанием на плоскости (5-7 минут). В этом случае результат учитывают невооруженным глазом. Проведение реакции в платах или на плоскости не противоречит сути и принципам классической КРА, при условии соблюдения основных требований и правил, обеспечивающих корректность опыта. Капли ингредиентов должны быть одного размера, без пузырей воздуха и натеков из верхней части пипетки. Компоненты реакции должны быть перемешаны тщательно и аккуратно, без привнесения дополнительных реагентов. Метод и условия титрования, способ учета в парных исследованиях (контроль-опыт) должны быть абсолютно одинаковыми. Сравнивать между собой можно лишь данные параллельных исследований, проведенных одновременно в идентичных условиях под контролем активности и специфичности реакции.

Этапы проведения КРА.

1 этап включает в себя выбор диагностических сывороток и метода титрования, исследование реагентов перед абсорбцией. Выбор сывороток, их титр и способ титрования выбирают для каждой конкретной экспертизы,

учитывая характер пятна и предмета-носителя, особенностей образцов, предоставленных для сравнительного исследования, а также с учетом анализа имеющихся данных в отношении серологических свойств пятна. Как правило, для обнаружения АГ крови в пятнах, подходящими являются сыворотки, взятые в титре 1:32, реже 1:16, так как именно этот диапазон соответствует адсорбционной способности большинства образцов высушенной крови. Титрование в платах с макроучетом является (из всех известных методов) наименее трудоемким. При работе с гнилостно измененным материалом, с сильно загрязненными вещами существует опасность гемолиза тест-эритроцитов, в связи с чем предпочтительным методом для выполнения КРА является качание на плоскости с макроучетом, так как этот метод является максимально щадящим стандартные эритроциты, а их частичный гемолиз на учете реакции не скажется. Титр исходной сыворотки определяют тем же методом, которым будут проводить и основной опыт – исследование объектов. Разводят диагностические реагенты физиологическим раствором до конечного титра 1:32. Подготовленную сыворотку желательно оставить до утра, чтобы ее свойства стали устойчивыми и в процессе работы над объектами она свой титр не меняла. Утром желательно еще раз проверить титр разведенной сыворотки, чтобы в случае необходимости подкорректировать ее титр. Количественные соотношения навесок и сывороток для абсорбции составляют 50 мг пятна и 0,3 мл реагента. В случаях, когда размеры пятна не располагают таким большим количеством материала, можно работать и с меньшим количеством, однако при этом соблюдая пропорциональное соотношение исследуемого материала и диагностического реагента. Поскольку 0,3 мл соответствует 10 каплям, то минимальной навеской для исследования будет являться 5 мг материала, для которых потребуется всего 1 капля сыворотки.

Формула для расчета соотношения навески и сыворотки:

$$(5 \text{ мг} + 1 \text{ капля}) \times n,$$

где n – переменная, зависящая от размера пятна, находящаяся в диапазоне от 1 до 10 (чаще всего $n=5$).

Навески необходимо готовить и для основного, и для контрольных опытов. Одновременно с каждым пятном необходимо исследовать участок предмета-носителя, незапятнанный кровью, взятый в непосредственной близости от объекта, что позволяет корректнее оценить реакцию с учетом

степени влияния носителя из-за специфического (иными словами, антигенного) загрязнения. В случаях неравномерного загрязнения предмета-носителя, а также при обширных размерах пятна, целесообразно для контрольного исследования использовать материал из различных участков вокруг объекта. Допускается, в случаях значительного антигенного загрязнения предмета-носителя ткань для контроля брать не по весу, а по площади, сопоставляя ее с площадью навески пятна, что позволяет уравнивать количество ткани в объекте и в контроле. Если исследованию подлежат замытые пятна, то в качестве контрольного выбирают участок, проверенный на отсутствие крови самым чувствительным методом флуоресцентной микроскопии гематопорфирина, при этом светящиеся глыбки в материале должны отсутствовать. При исследовании пятен с микробным загрязнением, вследствие их загнивания или заплесневения, материал перед этапом абсорбции необходимо прогреть в сухожаровом шкафу при одном из режимов: а) 90 минут при температуре 80°C; б) 60 минут при 100-110°C; в) 30-40 минут при 120°C. Предварительное прогревание материала позволяет снять побочное неспецифическое влияние на сыворотки, так как антигены крови такую температуру выдерживают, а эклипсные (микробные) подвергаются деструкции.

На 2 этапе проведения КРА – абсорбции, чтобы облегчить образование комплексов антиген – антитело и усилить выраженность реакции, навески с диагностическими реагентами необходимо поместить в условия пониженной температуры (+4°C) на срок 18 и более часов. При удлинении сроков абсорбции необходимо учитывать степень загрязнения предмета, чтобы избежать влияния контроля предмета-носителя. Потребность в пониженной температуре обусловлена тем, что изосыворотки и МКАТ относятся к иммуноглобулинам класса М и являются АГ холодогового типа. Из-за слабых абсорбционных свойств пятен крови, сокращать срок абсорбции до 3-6 часов не рекомендуется, так как АГ крови являются более слабыми, чем в выделениях, кроме того, их сила уменьшается в процессе высыхания. Таким образом, дополнительно ослабленные внешним воздействием, АГ крови могут не успеть проявить себя за время короткой абсорбции, что на этапе учета приведет к ложноотрицательному результату реакции. В связи с вышесказанным, для старых, плохо растворимых пятен, а также для пятен с ослабленными свойствами (застиранные, воздействие высокой температуры)

необходимо не только снизить титр диагностической сыворотки до 1:16, а также увеличить время абсорбции до двух-трех суток, при условии относительно чистого предмета-носителя.

На 3 этапе проведения КРА – титрования сывороток после абсорбции, материал с абсорбированной сывороткой вынимают из холодильника не весь сразу, а отдельными партиями, чтобы он не успевал согреться, так как при повышении температуры даже до значений комнатной, может начаться распад, иными словами растворение комплексов антиген – антитело.

Титровать абсорбированные диагностические реагенты следует точно так же, как и до абсорбции, соблюдая выбранные ранее параметры. Исследуемый материал и соответствующий ему контрольный необходимо титровать одномоментно, выбранным ранее способом (в одной плате, на одной плоскости, либо при одновременном центрифугировании).

В одном ряду всегда должна быть раститрована исходная неабсорбированная сыворотка, чтобы иметь представление о ее титре в настоящий момент. Удобнее сначала титровать сыворотку одной специфичности (α , анти-А), а потом – другой (β , анти-В).

Начинать ряд необходимо пробой с неразведенной сывороткой, которая осталась после абсорбции. Если абсорбированной сыворотки осталось мало, то можно взять 1 небольшую ее каплю, в крайнем случае этой лункой можно пренебречь. Последним в ряду всегда должно быть разведение на 1 ступень большее, чем титр исходной сыворотки, чтобы видеть, где агглютинация отсутствует, именно от этой ступени начинают отсчет ступеней поглощения.

На этапе оценки результатов реакции необходимо сопоставить титр исходной неабсорбированной сыворотки и данные титрования контрольного и исследуемого материала. Достоверно судят о выявлении АГ при снижении титра сыворотки в опытном исследовании не менее чем на три ступени поглощения (по сравнению с соответствующим контрольным).

Наличие двух ступеней поглощения может говорить о присутствии слабого АГ, наличие которого необходимо доказывать иным методом. Также две ступени поглощения могут быть результатом технической погрешности, в этом случае титрование абсорбированных сывороток нужно повторить. Наличие одной ступени поглощения может быть следствием таких же причин.

При макроскопическом учете результата КРА необходимо строго соблюдать количественные соотношения сывороток и тест-эритроцитов, так

как нарушение пропорции может привести к некорректному ходу реакции и недостоверным результатам, связанным с ошибочным учетом.

Избыток антигена (в данном случае – тест-эритроцитов), во-первых, может вызвать задержку реакции за счет «феномена зоны», а, во-вторых, слабая агглютинация в правой части ряда визуально может быть не замечена. Таким образом, будут посчитаны 3 «ложные» ступени поглощения и констатировано «выявление» АГ при сравнении с титром правильно исследованной сыворотки, как исходной, так и абсорбированной предметом-носителем.

Техническая погрешность во время титрования может привести к ослаблению титра сыворотки на 1-2 ступени поглощения, если к этому фактору добавится избыток АГ, то ослабление агглютинации будет не замечено не только в правой, а также и в левой части ряда, что на этапе оценки результата реакции будет учтено, как снижение титра на 4-6 ступеней поглощения по сравнению с контролем и установлено «наличие» отсутствующего АГ.

При добавлении к сыворотке гетерологичных тест-эритроцитов агглютинация вовсе не наступит и будет установлено 6 «ложных» ступеней. Добавляя одновременно тест-эритроциты и в основной, и в контрольный опыты, эксперт по отсутствию агглютинации в исходной сыворотке сможет предположить и диагностировать техническую погрешность на этапе учета реакции.

Устранение влияния предмета-носителя в количественной реакции абсорбции, иными словами «нагрузкой» агглютининами, применяют при значительном снижении титра сыворотки контрольным участком предмета-носителя, когда разница в снижении титра сыворотки, абсорбированной контролем и пятном, составляет 2 ступени поглощения. В таких случаях после проведения первой КРА, абсорбированную сыворотку полностью удаляют и из пятна, и из контроля и добавляют новую порцию сыворотки с таким же (1:32) или более высоким (1:64) титром. После повторной абсорбции («нагрузки» агглютининами) вновь учитывают результаты; как правило, предмет-носитель титр новой порции сыворотки уже не может существенно изменить, тогда как пятно еще сохраняет способность к связыванию определенного количества АГ и продолжает снижать титр добавленной сыворотки. Если после второй абсорбции контроль и пятно продолжают

снижать титр сыворотки, можно провести еще одну нагрузку агглютинидами – третью абсорбцию. Как правило, третья абсорбция дает положительный результат только, если в пятне присутствует очень сильный АГ, и в целом необходимо добавить, что нагрузки возможны только при наличии сильного АГ в пятне. К исследуемому материалу можно добавить новую порцию сыворотки, не удаляя старой. Титр новой порции сыворотки при этом несколько снижается, что способствует проявлению слабого АГ. Такой технический прием также позволяет экономить время. Увеличение количества диагностического реагента, при обычном титре сыворотки, увеличивает абсолютное количество АТ и часть их идет на «гашение» влияния предмета-носителя. Влияние предмета-носителя во время второй абсорбции можно снизить укорочением срока абсорбции, однако при слабых АГ в пятнах крови это опасно ложноотрицательным результатом. Необходимо отметить, что хотя метод нагрузки помогает устранить влияние предмета-носителя, для работы со слабыми АГ он непригоден. В основе принципа выявления слабых АГ в пятнах крови методом КРА является применение диагностических реагентов с титром 1:16-1:20, в которых количество антител понижено. В таких условиях реакции слабые АГ с сыворотками пониженного титра могут проявить себя полнее. Титрование абсорбированной сыворотки может быть как кратным, так и развернутым (в смежных разведениях).

Необходимость применения КРА возникает: при выраженном влиянии предмета-носителя на диагностическую сыворотку (по результатам РАЭ), поскольку это влияние в КРА проявляется значительно меньше; для сравнения абсорбционной способности крови в исследуемом пятне и в образце, представленном для исследования; при наличии высокой вероятности возникновения блокады антител в фазе элюции, что приводит к ложноотрицательному результату РАЭ, т.е. к не выявлению АГ.

К недостаткам КРА по сравнению с РАЭ, следует отнести ее низкую чувствительность (при этом могут быть не выявлены слабые АГ), потребность в большом количестве материала исследуемого пятна (невозможность работы с микрообъектами). Вместе с тем, по КРА можно судить о силе АГ (по числу ступеней поглощения). Наиболее оптимальным способом для подбора титра сывороток и работы с пятнами методом КРА является титрование с последующим отстаиванием в платах или качанием на плоскости. При макроскопическом результате учета КРА необходимо строго соблюдать

количественные соотношения сывороток и тест-эритроцитов, так как нарушение пропорции может привести к некорректному ходу реакции и недостоверным результатам, связанным с ошибочным учетом. Предварительное прогревание материала при исследовании пятен крови, подвергшихся микробному загрязнению, позволяет снять побочное неспецифическое влияние на сыворотки.

Количественная реакция абсорбции-элюции (КРАЭ). При производстве экспертиз для установления групповых свойств пятен крови по системе АВ0 применяется реакция абсорбции-элюции (РАЭ) и количественная реакция абсорбции агглютининов (КРА). Количественное соотношение двух базовых реакций – РАЭ и КРА, применяемых экспертами для установления групповой принадлежности крови в пятнах на вещественных доказательствах, составляет 5:1. Существует мнение, что применение КРА, имеющей относительно низкую чувствительность, не является обязательным, но, вместе с тем, при проведении экспертиз выделений КРА должна быть проведена в обязательном порядке для диагностики категории выделительства. Преимущественное применение РАЭ объясняется следующими достоинствами: реакция позволяет исследовать пятна малой величины, дает возможность выявлять даже самые слабые АГ (при отсутствии влияния предмета-носителя), расширяет изосерологическую диагностику по антигенам других систем (MNSs, P, Rh). Однако, эта реакция является качественной и не позволяет судить о силе выявляемых АГ, в связи с чем существует возможность получения ложноотрицательных результатов. Использование КРА позволяет судить о силе АГ по тому, на сколько ступеней поглощения снизился титр абсорбированной сыворотки. Вместе с тем, у КРА имеются и недостатки, обусловленные необходимостью исследования относительно большого количества материала и низкой чувствительностью реакции. Необходимость применения КРА возникает: а) при выраженном влиянии предмета-носителя на диагностическую сыворотку (по результатам РАЭ), поскольку это влияние в реакции количественной абсорбции проявляется значительно меньше; б) для сравнения абсорбционной способности крови в исследуемом пятне и в образце, представленном для исследования; в) при наличии высокой вероятности возникновения блокады антител в фазе элюции, что приводит к ложноотрицательному результату РАЭ, т.е. к не выявлению АГ.

Необходимо отметить, что высокая вероятность возникновения блокады АТ в фазе элюции, приводящее к ложноотрицательному результату РАЭ, является основным показанием для проведения КРА.

Особенно важно это явление принимать во внимание в экспертизах, в которых образцы крови лиц, возможных участников происшествия, отсутствуют или при не обнаружении искомого АГ (согласно обстоятельствам дела и принадлежности вещественного доказательства) в тех экспертизах, где образцы крови для сравнительного исследования представлены. Количественную реакцию абсорбции можно проводить в общепринятых условиях, расходуя на опыт минимум 50 мг материала в экспертизах, в которых исследуемые объекты имеют значительные размеры, однако такой объем материала не всегда имеется в распоряжении эксперта. При изучении следов крови малой величины возникают сложности проведения КРА. Для того, чтобы соблюсти определенные количественные соотношения изучаемого материала и используемых реагентов предложено совместное проведение КРА и РАЭ в малом объеме исследуемого материала. Количественная реакция абсорбции-элюции (КРАЭ) была разработана доц. Сулейменовой Г.М. и доц. Зиминной Ю.В. в 1997 году для изучения следов выделений в объектах малой величины с целью обеспечения дополнительной (кроме антигенной) характеристики выделения по категории выделения его обладателя (секретор, несекретор) [68].

Принцип данной методики состоит в сочетании титрования абсорбированных в ходе РАЭ сывороток, использовании полученных результатов для учета степени абсорбции искомого антигена (КРА) с дальнейшим проведением обычной РАЭ. Указанные авторы выявили следующие преимущества КРАЭ: сокращение сроков исследования (в результате их одновременного проведения), экономию исследуемого материала и используемых реагентов.

Практический опыт экспертной деятельности свидетельствует о том, что при установлении антигенной принадлежности насыщенных образцов крови заведомо известных групп, периодически возникает явление блокады АТ в фазе элюции. Это явление обусловлено высокой абсорбционной способностью группового фактора и может послужить причиной не обнаружения искомого свойства при учете реакции после фазы элюции. Для устранения явления блокады АТ рекомендуется проведение пробы на истощение абсорбированной

сыворотки (проверка одноименными тест-эритроцитами после фазы абсорбции). Однако, истощение абсорбированной сыворотки не всегда происходит полностью, о чем свидетельствует значительно меньшая выраженность агглютинации тест-эритроцитов, чем в исходной неабсорбированной сыворотке. В этих случаях проверяют активность (титр) абсорбированной сыворотки путем ее кратного титрования. Показатель степени абсорбции в 3-5 ступеней поглощения является достаточным для диагностики присутствия искомого АГ. Предположив возможность явления блокады и в достаточно насыщенных пятнах крови на вещественных доказательствах, можно применять КРАЭ во всех необходимых случаях, когда отрицательный результат учета фазы элюции может оказаться ложным в связи с присутствием АГ достаточной силы, чтобы вызвать феномен блокады.

Ход исследования. Реакцию проводят следующим образом: заведомые образцы крови, материал пятна и предмета-носителя (2-4 нити длиной 1,0 см) не фиксируют, заливают стандартными реагентами анти-А и анти-В изосыворотки или моноклональные антитела (МКАТ) в титре 1:64-128 (макроучет и микроучет, соответственно). Фазы абсорбции и элюции осуществляли при обычных условиях: абсорбция 24 часа при температуре +4-6°С, отмывание от неабсорбированных антител 4-5 кратное, фаза элюции – в физраствор при температуре 56°С в течение 25 минут. Учет макро- и микроскопический. Микроскопический учет – после добавления эритроцитов и центрифугирования, а макроскопический – после титрования в планшетках. После учета результатов элюции в случае не обнаружения искомого АГ (возможно заблокированного) переходят к этапу учета степени абсорбции – титрованию в кратных разведениях абсорбированной сыворотки. Результаты реакции учитывают путем сравнения титра исходной и абсорбированной сыворотки. Снижение титра абсорбированной сыворотки на три-четыре и более ступеней поглощения по сравнению с таковым при исследовании контрольного участка предмета-носителя свидетельствует об обнаружении в объекте АГ достаточной силы, способного вызвать блокаду АГ в фазе элюции. Отсутствие снижения титра сыворотки, абсорбированной объектом, свидетельствует о том, что в данном объекте не выявление АГ после фазы элюции действительно является его истинным отсутствием. Снижение титра на две и менее ступени, влияние предмета-носителя на реагенты, такие нечеткие результаты являются показанием для дальнейшего продолжения

исследования объекта. При влиянии предмета-носителя проводят повторные опыты, применяя те же реагенты с более высоким титром, а также перевод объекта на марлю. Поскольку при слабой насыщенности объектов явление блокады антител практически исключено, проводить количественный учет абсорбции необязательно, поэтому при отрицательном результате РАЭ с ненасыщенными объектами рекомендовано использовать более чувствительный вариант элюции – во взвесь эритроцитов, меняют соотношение изучаемого материала и используемого реагента в пользу искомого антигена, удваивая количество исследуемого материала.

Блокада АТ сильным АГ чаще возникает с изогемагглютинирующими реагентами, даже в пятнах средней насыщенности. В связи с этим фактом, при неудовлетворительных результатах проведенного исследования (обеих фаз КРАЭ) проводят повторные опыты КРАЭ с реагентами, не использованными ранее (например, с моноклональными, если первично применяли изосыворотки). В таких случаях АГ, который в большинстве опытов в фазе элюции блокировал антитела изосывороток, не вызывал блокады МКАТ. Благодаря общеизвестному факту – высокой специфичности МКАТ – оказалось допустимым использовать этот реагент в более высоком титре, чем 1:128 (под контролем опыта с гетерологичным АГ).

Таким образом, КРАЭ является взаимодополняющим сочетанием двух иммунологических реакций, и, вместе с тем, необходимым техническим и тактическим приемом, обеспечивающим решение трудной экспертной задачи: выявление АГ при феномене блокады АТ или достоверное подтверждение их отсутствия в случае отрицательного результата реакции абсорбции-элюции.

Усовершенствование общепринятой экспертной тактики фактически сводится к малообъемному дополнительному опыту – учету результата фазы абсорбции РАЭ путем установления титра абсорбированного реагента, что трансформирует РАЭ в две совместно проведенные иммунологические реакции – количественную реакцию абсорбции и реакцию абсорбции-элюции, обозначаемые как КРАЭ.

Применение КРАЭ для определения групповых факторов в пятнах крови создает условия для взаимопроверяемости результатов двух иммунологических реакций – КРА и РАЭ, а именно позволяет контролировать отрицательный итог РАЭ и отличать ложный вариант невыявления группового

свойства, обусловленный блокадой АТ сильным АГ, от истинного его отсутствия.

РСА, как и РАЭ, основана на том, что молекула АТ имеет, по крайней мере, две валентности или два активных центра, способных соединяться с соответствующими антигенными детерминантами. РСА не сопровождается искусственной диссоциацией комплексов антиген – антитело, а заключается в использовании свободных активных центров абсорбированных антигеном антител для агглютинации тест-эритроцитов той же групповой специфичности. Принципиальным различием в подходе к проведению РАЭ и РСА является то, что для успешного проведения РАЭ необходимо максимально усиливать искусственную диссоциацию комплексов антиген – антитело, а для проведения РСА - максимально ограничить спонтанную диссоциацию этих комплексов.

Для реакции используют α - и β -изосыворотки и экстракты анти-Н – с титром 1 :64 и выше. Предварительное фиксирование материала метанолом, проведение абсорбции и удаление несвязавшихся АТ в РСА осуществляются в той же последовательности, что и при РАЭ. К отмытым ниточкам объекта добавляют взвесь эритроцитов-индикаторов, причем для эритроцитов групп А β и В α готовят 0,5% взвесь, а для эритроцитов группы О $\alpha\beta$ – 1,5% взвесь (на 1,5% растворе сыворотки группы АВ, предварительно проверенной на отсутствие экстраагглютининов).

После добавления соответствующих тест-эритроцитов или индикаторной взвеси препараты инкубируют во влажных камерах в течение 1-1,5 часов при 6°C. Учет результатов РСА проводят микроскопически на предметных стеклах, сначала не накрывая их покровными стеклами, а затем – и под ними. Появление на ниточках крови эритроцитарных бус и отсутствие их в контрольных участках свидетельствует о наличии того или иного АГ. Свободно плавающие агглютинаты эритроцитов в расчет не принимают. В таких случаях увеличивают время контакта объекта с тест-эритроцитами или исследуют другие участки пятна при помощи сывороток более высокого титра. При сомнительных результатах увеличивают время абсорбции АТ или же осуществляют повторную постановку реакции [78].

7.4. Выявление антигенов системы MNSs

Выявление антигенов системы MNSs в жидкой крови. 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-M. В среднюю часть также помещают по 1 большой капле сыворотки анти-N. Рядом с одной каплей сыворотки анти-M помещают небольшое количество цельных отмытых эритроцитов группы OM. Соотношение между сывороткой и эритроцитами должно быть равно 1:10. Рядом с другой каплей сыворотки анти-M помещают эритроциты группы OMN. Соответственно к 1 капле сыворотки анти-N приливают эритроциты группы ON, к другой – группы OMN. 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-M, а с другой стороны такую же каплю сыворотки анти-N. Около капли сыворотки анти-M помещают каплю эритроцитов группы ON, а возле капли сыворотки анти-N – цельные эритроциты группы OM. Сыворотки и эритроциты смешивают стеклянной палочкой и отмечают время по секундомеру. В течение времени наблюдения – 5 минут – агглютинация должна отсутствовать [44].

Определение антигенов MN в пятнах крови. Проводят с помощью РАЭ. 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-M, ко второй – сыворотку анти-N с титром 1:32–1:16. Препараты экспонируют 20 часов при температуре 4°C во влажных камерах. Затем препараты 5 раз промывают охлажденным (2°C) изотоническим раствором хлорида натрия. Для проведения стадии элюции препараты заливают 0,2% взвесью трижды отмытых стандартных эритроцитов на 1% растворе проверенного альбумина. К препаратам, в которых ранее находилась сыворотка анти-M, 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 минут при температуре 52°C, а затем еще 1,5 часа выдерживают при комнатной температуре. Перед учетом результатов к каждому препарату приливают по 1 капле изотонического раствора хлорида натрия, препараты накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

7.5. Выявление антигена D системы Резус в пятнах крови

Варианты РАЭ, предложенные в свое время для определения групповой принадлежности пятен крови по системе Rh (D + и D -), в т.ч. с использованием трипсин-альбуминового и папаинового ферментных тестов, ввиду своей сложности, нестабильности получаемых результатов и малой информативности для целей судебно-медицинской экспертизы в практической работе применять нецелесообразно [11].

Перспективной к использованию в свое время являлась технология по выявлению антигена D системы Резус в пятнах крови, предназначенная для выявления резус-антигенов системы Резус, обладающих большим полиморфизмом, с помощью РАЭ в следах крови с применением протеаз, с предполагаемой давностью образования не более 6 месяцев [56].

Применить данную методику на практике в настоящее время не представляется возможным ввиду прекращения производства в России необходимых антирезусных сывороток.

7.6. Определение фенотипов гаптоглобина

Гаптоглобин (Hr) – это белок сыворотки крови. Его биологическая функция – связывание свободного гемоглобина (Hb) из сыворотки крови. По своей химической природе это гликопротеин: 83 % – белок, 17% – углеводы. При электрофорезе он перемещается вместе с фракцией α_2 -глобулинов, где его доля составляет 25-30%. В сыворотке крови его содержание 1-2% от общего белка.

У людей различают три типа Hr, которые имеют разную электрофоретическую подвижность и молекулярный вес: Hr 1-1, Hr 2-1, Hr 2-2. Частота встречаемости фенотипов Hr у взрослого населения следующая: тип Hr 1-1 – 11%, тип Hr 2-1 – 51%, тип Hr 2-2 – 38 %. Фенотипы белковой

системы Н_r являются ценным источником информации при групповой идентификации пятен крови на вещественных доказательствах. Особенное значение диагностика фенотипов Н_r приобретает в случаях, когда проходящие по делу лица имеют одинаковую группу крови по системе АВ0.

Методы, предлагаемые для этой цели, прошли определенную фазу развития: от техники на агаровом и крахмальном геле до методики проведения электрофореза в полиакриламидном геле. В настоящее время существует несколько вариантов определения фенотипов гаптоглобина: Н_r в жидкой крови и в пятнах методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Практический интерес представляет современный усовершенствованный способ определения фенотипов Н_r в жидкой крови и в пятнах методом вертикального электрофореза в ПААГ, который отличается высокой производительностью (обеспечивает определение фенотипов Н_r в 40 объектах одновременно) и высокой экономичностью [67].

По данной методике определение фенотипов Н_r проводится в ПААГ толщиной 1 мм, уменьшена плотность нижнего ПААГ с 8% до 6,6% и верхнего слоя ПААГ с 4,5 % до 3,4 %. Для формирования ПААГ используют стекла размерами 10×20 см. Используют две гребенки с 20-ю зубцами, что позволяет одновременно исследовать 40 жидких образцов крови или вытяжек из пятен крови. В процессе пробоподготовки очистку вытяжек из пятен крови проводят хлороформом вместе с предметом-носителем. Определение фенотипов Н_r в образцах жидкой и гемолизированной крови проводят в двухслойном ПААГ, одновременно с вытяжками из пятен крови. Для эффективного заполнения карманов ПААГ сыворотку жидкой крови замораживают и хранят необходимое время до начала исследования. Герметизацию камеры проводят отрезками фильтровальной бумаги с применением состава нижнего геля. При приготовлении проявляющего раствора бензидин растворяют в ледяной уксусной кислоте.

Методика определения фенотипов Н_r методом вертикального электрофореза в ПААГ может быть использована для дифференцирования жидкой крови, следов крови, «смешанных» следов крови и выделений в следующих случаях: при одногруппности образцов крови по системе АВ0; при получении нечетких результатов при определении группы крови по системе АВ0; при решении вопроса о возможной примеси в пятнах крови лица группы Оαβ; при решении вопроса о возможности происхождения крови от одного

лица группы АВ0 либо нескольких лиц с различным сочетанием групповых свойств А и В; при отсутствии образцов крови потерпевшего либо обвиняемого; при исследовании гнилостно измененных образцов крови, мышечной ткани и пятен крови на вещественных доказательствах; для дифференцирования «смешанных» пятен крови нескольких лиц; при исследовании «смешанных» пятен (кровь + выделения), поскольку Нр определяется лишь в крови, а в выделениях его не устанавливают; для дифференцирования крови человека в следах с примесью крови животных; для дифференцирования крови взрослого человека и новорожденного, поскольку у новорожденных Нр практически не определяется; при влиянии предметов-носителей на результаты по системе АВ0; при отсутствии контролей предметов-носителей.

Для проведения исследования используют оборудование и реактивы, стандартные для отделений судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы СЭО.

Методика. Определение фенотипов Нр в жидкой крови и пятнах крови методом вертикального электрофореза проводят в двухслойном ПААГ.

1 этап. Приготовление растворов.

1.1.1. Электродный трис-глициновый буфер: трис 1,5 г, глицин 12 г, дистиллированная вода 3 литра. Хранить при комнатной температуре.

1.1.2. Полимер «Акрис»: акриламид 150 г, бисакриламид 5 г, дистиллированная вода 0,5 литра. Раствор профильтровать, хранить в темной бутылки при температуре +4-6°C.

1.1.3. Полимер «Трис НС1» – гелевый раствор: трис 72,6 г, ТЭМЭД-0,92 мл, концентрированная соляная кислота – 5 мл, дистиллированная вода до 200 мл. Хранить в темной бутылки при температуре +4-6°C.

1.1.4. Раствор для окраски гелевых пластин: бензидин 50 мг, 10% уксусная кислота 120 мл, пергидроль 10 капель. Готовить непосредственно перед окраской. Бензидин растворить в 2мл ледяной уксусной кислоты, затем добавить 10% уксусную кислоту.

1.1.5. 15% раствор сахарозы на электродном буфере: сахароза 1,5 г, дистиллированная вода до 10 мл. Хранить при температуре +4-6°C.

1.1.6. Раствор гемоглобина: у донора с типом НР 1-1 взять 1,5 мл крови, отмыть физиологическим раствором 7 раз. Тщательно убрать

физиологический раствор и добавить 2 мл дистиллированной воды. Хранить в замороженном состоянии.

2 этап. *Подготовка прибора (аппарата для электрофореза) к работе, формирование ПААГ на 40 исследуемых объектов.*

2.1.1. Сборка гелевой ячейки: используют 4 стекла размерами 10×20 см (два прямоугольных и два с вырезом). С внутренней стороны камеры устанавливают стекла с вырезом. Между стеклами вставляют «спейсеры» толщиной 1 мм, а с нижней стороны стекол вставляют сложенный в 4 слоя отрезок фильтровальной бумаги шириной 2-3 см, с выступающим свободным краем длиной 0,5-1 см. Стекла со спейсерами и фильтровальной бумагой внизу крепят к камере прилагающимися зажимами.

2.1.2. Приготовление нижнего разделительного 6,6% геля: «Акрис» 7,2мл, трис 4,8 мл, дистиллированная вода 18 мл. Компоненты смешивают, используют для герметизации камеры и формирования нижнего геля.

2.1.3 Герметизация камеры: камеру устанавливают под углом 30-45°. К 10 мл смеси нижнего геля добавляют 20 мг персульфата аммония. После растворения персульфата аммония раствор быстро вносят на внутренний край фильтровальной бумаги. После полимеризации образуется ПААГ высотой от 0,5 до 1 см, надежно герметизирующий камеру. Камеру устанавливают вертикально, вставляют «гребенку» толщиной 1 мм с 20 зубцами и ниже на 0,5-2 см от зубцов делают отметку. Гребенки убирают, к оставшемуся объему для нижнего геля добавляют 60 мг персульфата аммония. После растворения персульфата аммония, раствор быстро вносят на герметизирующий слой ПААГ. Сверху наносят 5-10 мл дистиллированной воды для выравнивания свободного края ПААГ. После окончания полимеризации воду сливают.

2.1.4. Приготовление верхнего концентрирующего 3,4% геля. «Акрис» 1,4 мл, трис 1,2 мл, дист. вода 8 мл, персульфат аммония 20 мг, перемешивают, вносят в камеру и вставляют гребенки. После окончания полимеризации камеру заполняют буферным раствором. Если разгонку необходимо проводить в одной гелевой ячейке (20 исследований), то объемы верхнего и нижнего ПААГ уменьшают в 2 раза.

3 этап. *Приготовление вытяжек из пятен крови, подготовка жидкой крови.* В зависимости от насыщенности и давности пятен крови вырезают участки размерами от 0,3×0,3 см до 3×3 см, можно исследовать соскобы и смывы. Экстрагирование проводят 15% раствором сахарозы 18-24 часа в

условиях холодильника в пробирках «эппендорф» объемом 1,8 мл. После экстрагирования в пробирки вместе с предметом носителем вносят хлороформ в соотношении 1:1. Содержимое перемешивают до появления твердой пены. Пробирки центрифугируют 20 минут при 4000 об./минуту. Верхний слой служит для исследования. Если вытяжка бесцветная, добавляют 10 мкл гемоглобина. В карманы вносят 60-80 мкл вытяжки. Внесение хлороформа в пробирки к вытяжкам с предметом-носителем позволяет эффективнее извлекать сыворотку из пятна крови, сократить время приготовления вытяжек. В первый и последний карманы следует вносить вытяжки из заведомых образцов крови. После центрифугирования *жидкой крови* отделяют сыворотку, если сыворотка бесцветная, то добавляют 10 мкл гемоглобина. Исследование проводят одновременно с вытяжками из пятен крови в двухслойном ПААГ. Необходимо помнить, что для полного заполнения 20 или 40 карманов образцы сыворотки жидкой крови можно накапливать, для этого их замораживают при температуре -20°C и хранят необходимое время до исследования. Гемолизированную и загнившую кровь сначала центрифугируют 10 мин при 4000 об./минуту. К 1 мл верхнего слоя добавляют 1 мл дистиллированной воды, перемешивают. Берут 100 мкл смеси, добавляют 10 мкл 60% сахарозы, обрабатывают хлороформом и вносят в карман ПААГ в количестве 80мкл.

4 этап. Проведение электрофореза. Входной электрофорез проводят при напряжении 200 В и силе тока 50 мА 30 мин, затем при напряжении 300 В и силе тока 80-100 мА 2-3 часа. Электрофорез завершают после перемещения фронта гемоглобина на 5 см от старта.

5 этап. Окраска гелевых пластин ПААГ. Из прибора сливают буферный раствор, разбирают гелевые ячейки, извлекают пластины ПААГ, отрезают нижний край и метят его, отрезая углы ПААГ. Пластины ПААГ помещают в проявляющий раствор на 20 минут. Затем добавляют 8-10 капель пергидроля. Учет результатов проводят в течение часа.

6 этап. Учет результатов. На фореграмме выявляют зоны Нр. Фенотип Нр 1-1 представлен единичной ярко выраженной, плотной фракцией. Он располагается над полосой Нв. 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. Группы (фенотипы) Нр крови определяют путем сопоставления уровней расположения фракций исследуемых и контрольных образцов.

7.7. Дифференцирование периферической и менструальной крови

Необходимо отметить, что органно-тканевое происхождение клеток (преимущественно на орудиях травмы) устанавливают при судебно-цитологическом исследовании. Термин «региональное происхождение» в отношении периферической крови является не совсем точным в том смысле, что фактически при наружном кровотечении установить наличие и, соответственно, происхождение крови из какого-либо поврежденного органа в следах на вещественных доказательствах не представляется возможным, ввиду чрезвычайно малого количества отторгаемых клеток (например, эпителиальных клеток из полости носа или клеток внутренних органов при травме).

Для дифференцирования периферической и менструальной крови в может быть применена цитологическая диагностика и электрофоретические методы, с помощью которых выявляют фракции альбуминов. Цитологический метод является предпочтительным, электрофоретическая методика сложнее в исполнении и требует наличия специальных реагентов.

Установление менструальной природы крови методом электрофореза. Принцип метода состоит в том, что при воздействии раствора трипсина на вырезку из исследуемого следа крови в вытяжку из пятна менструальной крови первой выходит фракция альбумина. Это обусловлено тем, что альбумин имеет меньший размер молекулы по сравнению с другими белками крови. Так как пятно менструальной крови практически не содержит фибрина, при действии трипсина в нем сразу же начинают растворяться белки крови. В пятне крови иного происхождения имеется фибрин, который в процессе старения пятен уплотняется и образует пленки, препятствующие выходу в раствор белков крови. За определенное время воздействия трипсина в вытяжку из пятна менструальной крови выйдет альбумин, в то время как вытяжка из пятна крови иного происхождения не будет содержать последнего. Обязательным условием для этого вида исследования является наличие в лаборатории контрольных образцов менструальной и периферической крови одинаковой давности. Образцы, взятые на марлю, хранят при комнатной температуре в сухом месте в отдельных бумажных пакетах. Для

электрофоретического исследования из пятен готовят навески, содержащие 10 мг сухой крови. В случае небольшого количества материала количество сухой крови может быть уменьшено до 8 или 5 мг.

Ход исследования зависит от давности исследуемого объекта.

Если давность крови менее 35 суток, применяется следующий вариант:

1. Готовят навески из пятна крови и контрольных образцов. Кусочки из пятен фиксируют 96% этанолом в течение 30 минут или проглаживают горячим утюгом в течение 3-5 мин через бумагу (утюг должен быть нагрет до температуры не менее 120-140°C);

2. Кусочки, обработанные указанным образом, помещают в пробирки и заливают 0,01% раствором трипсина;

3. Материал выдерживают в растворе трипсина в течение 0,5-1,5 минут при комнатной температуре (время экстрагирования трипсином определяют по растворению менструальной крови);

4. По окончании экспозиции кусочки осторожно вынимают из пробирок препаровальной иглой.

При давности пятен более 35 суток их не фиксируют. Навески пятен заливают 0,2% раствором трипсина. Время экстрагирования варьирует от 1,5 до 60 минут, в зависимости от давности пятен.

При давности пятен от 35 суток до 75 суток, в каждом конкретном случае выбирают срок экстрагирования, исходя от времени, необходимого для растворения менструальной крови. Это осуществляют по формуле $t = 2 \times T$, где t – время экспозиции, T – давность пятна в сутках.

Если давность пятна 1 месяц и 5 суток (35 суток), значит время воздействия трипсина будет равно 75, т.е. 1 минуте и 15 секундам.

Для очень старых пятен крови (более 25 месяцев) время экстрагирования увеличивается до 25 минут и более (точное время также устанавливают по растворению менструальной крови). Для внесения в карманы гелевой пластины к 3 объемам вытяжки прибавляют 2 объема 60% раствора сахарозы в электродном буфере.

Приготовление полиакриламидного геля:

1. *Акрис:* Акриламид – 30 г., бисакриламид – 0,8 г., дистиллированная вода до 100 мл. Профильтровать.

2. *Гелевый буфер (pH 8,5):* трис – 5,5 г., борная кислота – 2,7 г., динатриевая соль ЭДТА – 0,45 г., дистиллированная вода – до 125 мл, ТЭМЕД – 0,6 мл.

3. *Электродный буфер (pH 7,9):* трис – 33,0 г., борная кислота – 39,0 г., динатриевая соль ЭДТА – 2,7 г., дистиллированная вода – до 3 л.

Приготовление 5% полиакриламидного геля: Акрис – 8,5 мл, гелевый буфер – 6,2 мл, дистиллированная вода – 37,7 мл, персульфат аммония – 35 мг. Указанные количества ингредиентов при приготовлении геля могут быть пропорционально изменены при использовании электрофоретических камер различного объема. Электрические параметры устанавливаются опытным путем в зависимости от размеров гелевого блока. В ходе фореа рекомендуется поддерживать максимально низкую температуру (около 2°C). Окраску фореграммы осуществляют с помощью красителя Кумасси голубого (70 мг Кумасси голубого растворяют в 150 мл дистиллированной воды и добавляют 150 мл 40% трихлоруксусной кислоты) в течение 20-30 минут при комнатной температуре. Положительным результатом является проявление фракции альбуминов в исследуемой крови и в контрольном образце менструальной крови на одном и том же уровне. В контрольном образце периферической крови фракция альбуминов должна отсутствовать.

7.8. Дифференцирование крови плода и взрослого человека в пятнах крови

Фетальный гемоглобин (HbF) – основной гемоглобин эмбриона в возрасте 9-13, недель, после 13-ой недели является основным гемоглобином плода, достигая к моменту рождения ребенка 70-80%. После 3 месяцев содержание его уменьшается, достигая к 1 году жизни 1-4%. Гемоглобин взрослых – (HbA) – является гемоглобином взрослых людей. Его синтез начинается с 8-11-недельного возраста эмбриона. К моменту рождения ребенка содержание его достигает 20%, а к одному году – 96-99%. Указанные типы гемоглобина различаются по своим физико-химическим, антигенным и иммуногенным свойствам. С целью дифференцирования HbF и HbA в свое время были предложены несколько методов: щелочной денатурации, электрофоретический, цитологический. Указанные методы имеют ряд ограничений, в связи с чем в настоящее время в практике судебно-медицинской экспертизы не применяются. Последний электрофоретический

метод был предложен в 2003 году и был основан на выявлении различий в электрофоретической подвижности HbA и HbF [34]. Данный метод также имеет значительные ограничения, что определяет нерациональность его применения в практической экспертной работе.

Метод осуществляют следующим образом. Электрофоретическое разделение образцов крови проводят в 1% агаровом геле с использованием трилон-цитрат-фосфатного буфера pH 5,9 ионной силой 0,05. Обязательно применение агарового геля с относительно большой величиной электроэндоосмоса, т.е. гелей, в которых гемоглобины, как взрослых, так и плода и новорожденных, мигрируют при электрофорезе от старта в сторону катода, а гемоглобины крови, связанные с сывороточными белками крови, мигрируют от старта в сторону анода. При этом дифференцирование HbF и HbA проводится на основании различий в их электрофоретической подвижности. Электрофоретическая подвижность HbF больше. Для контроля исследуют заведомо известные пятна крови взрослого человека и пятна крови новорожденных. Исследуемые вырезки пятен крови (2-4 ниточки, весом 1-2 мг) непосредственно вносят в лунки агарового геля, где их увлажняют изотоническим раствором хлорида натрия до полного заполнения лунок. Лунки могут быть как прямоугольной формы размерами 0,7×0,1 см, так и круглыми, диаметром 0,2 см; располагаются они в вертикальном ряду, расположенном в центре блока геля. Расстояние между лунками 3-4 мм. Контакт гелевого блока с переходным буфером осуществляется двумя листками фильтровальной бумаги. Длительность электрофореза 3,5-4,5 часа при силе тока 60-80 мА и напряжении 160-200 В. При этом катодный край максимальной электрофоретической подвижности пигментов крови (гемоглобинов) мигрирует на 3,5-4 см, а различия в электрофоретической подвижности контрольных образцов гемоглобинов взрослых и новорожденных достигают 5-10 мм. По окончании электрофореза пластинку окрашивают на пероксидазные свойства крови.

Заключение о выявлении HbF дается при совпадении катодного края максимальной электрофоретической подвижности гемоглобина исследуемого пятна крови с катодным краем максимальной электрофоретической подвижностью гемоглобина контрольного образца крови новорожденных, либо при наличии различий в их электрофоретической подвижности не более чем в 1-2 мм в сторону катода или анода, что зависит от исходного уровня

фетального гемоглобина крови, степени насыщенности пятна. При этом различия в электрофоретической подвижности гемоглобинов с контрольным образцом крови взрослого должно быть не менее 5 мм.

7.9. Установление давности и прижизненности образования пятен крови

Решение вопроса об установлении давности образования пятен крови затруднено из-за отсутствия надежных и достоверных методик, позволяющих диагностировать в каждом случае сроки образования пятен крови с достаточной точностью. Большинство лабораторных методов, предложенных в разное время для решения этого вопроса (гемоглобиновый, ферментный, хлоридный) позволяют определять давность образования пятен крови лишь в пределах ограниченного срока, и в настоящее время представляют только исторический интерес [80, 81].

Для дифференцирования следов крови от живых людей и трупов в 1970-е годы предлагался метод, основанный на регистрации тканевых (главным образом печеночных) изоферментов, отсутствующих в кровяном русле при жизни, появление которых в крови трупа обусловлено быстрым развитием процесса аутолиза. Ввиду своей сложности метод не нашел практического применения [79].

Последняя попытка установления возможности прижизненности и давности образования пятен крови, явилась разработка методики, в основе которой был положен фотоколориметрический метод [49].

Данная методика предполагает установления давности пятен крови на предмете-носителе из хлопчатобумажной ткани с точностью от $\pm 3,3$ до $\pm 8,5$ недель, а на предметах-носителях из прочих тканей от $\pm 3,2$ до $\pm 5,4$ недель при сроках давности пятна от 16 до 40 недель.

Для инструментальной объективизации прижизненности кровопотери и давности образования пятна крови на текстильном материале (хлопчатобумажная, джинсовая, шерстяная ткани, трикотаж) фотоколориметрическим методом Т.В. Найденовой предложен следующий рабочий алгоритм:

1. Подготовка объекта исследования и изготовление вытяжки из сухого пятна крови: из предмета-носителя с сухим пятном крови вырезается фрагмент квадратной формы с длинами сторон 1,1 см и взвешивается на аналитических

весах в сравнении с аналогичным чистым фрагментом того же материала (объект сравнения). По разнице между весом вырезанных фрагментов высчитывается вес сухой крови. Следует добиться, чтобы вес сухой крови в объекте исследования составлял 20 мг. Вырезанные фрагменты предмета-носителя и объекта сравнения помещаются в пробирки под номером, соответствующим номеру экспертизы, и заливаются 2 мл дистиллированной воды каждый. Экспозиция составляет 18-20 часов в условиях комнатной температуры. После десятикратного интенсивного встряхивания, пробирки с вытяжками и контролем центрифугируются в течение 5 минут при 1500 об./минуту. Из поверхностных слоев надосадочной жидкости стерильным одноразовым медицинским шприцем аспирируется жидкость в количестве 1,0 мл и помещается для изучения ее оптической плотности в стандартную заводскую кварцевую кювету 1,040 фотоколориметра.

2. Измерение оптической плотности вытяжки из пятна крови: используется дифференциальный метод измерения оптической плотности – измерение светопоглощения анализируемого раствора (вытяжка из пятна крови на предмете-носителе) относительно раствора сравнения (вытяжка из аналогичной «чистой» ткани), снижающий относительную ошибку анализа до 0,5-1%. С целью установления давности сухого пятна крови измерение оптической плотности осуществляется на длинах волн 380 нм, 400 нм, 410 нм. С целью установления образования пятна крови на текстильном материале от живого лица или от трупа, измерение оптической плотности производится на длинах волн 400 нм, 410 нм, 420 нм.

3. Расчет давности сухого пятна крови: Расчет возможен только в том случае, когда достоверно известно (установлено следственным путем), что давность сухого пятна находится в интервале от 16-ти до 40 недель и предмет-носитель находился в условиях комнатной температуры среды. Если предмет-носитель представляет собой фрагмент хлопчатобумажной ткани, расчет давности пятна крови производят по специальной формуле.

4. Расчет вероятности образования пятна кровью живого лица или трупа: расчет возможен только в том случае, когда достоверно известно (установлено следственным путем), что давность сухого пятна находится в интервале от 8-ми до 24-х недель и предмет-носитель (хлопчатобумажная ткань) находился в условиях комнатной температуры среды. Расчет вероятности образования

пятна крови от живого лица производится с использованием специального математического выражения.

Данный метод также не используется в практике СЭО ввиду заложенных в нем ограничений и допусков, не позволяющих достоверно, научно обоснованно, в полном объеме и в категоричной форме решить вопрос о давности и прижизненности образования пятен крови на вещественных доказательствах.

8. ЭКСПЕРТИЗА ВЫДЕЛЕНИЙ

В судебно-медицинской экспертной практике исследования вещественных доказательств перед экспертом зачастую возникает необходимость устанавливать присутствие на них следов различных выделений – слюны, пота, спермы, мочи для решения вопроса о возможности их происхождения от определенного лица, проходящего по делу. В таких случаях эксперт вначале устанавливает наличие следов тех или иных выделений на представленных ему вещественных доказательствах, а потом решает вопрос о возможности или невозможности их происхождения от определенного лица путем выявления в них групповых факторов.

Перед установлением группы выделений в следах на вещественных доказательствах подвергают исследованию образцы крови и выделений лиц, проходящих по делу. При этом устанавливают их групповую характеристику и, при необходимости, категорию выделительства.

Категорию выделительства трупа устанавливают либо путем исследования образцов его желчи или мочи по системе АВ0, либо крови по системе Lewis методом дот-ИФА.

8.1. Установление наличия слюны

Реакция на амилазу (пробирочный метод). Кусочки ткани из области исследуемых пятен, участков без видимых пятен, помещают в пробирки, заливают дистиллированной водой и экстрагируют 20 часов в условиях бытового холодильника при температуре +4°C. Для контроля используют образцы заведомой слюны. По истечении указанного времени экстракты переносят в чистые пробирки и добавляют 2% раствор крахмала в количестве. Пробирки помещают в термостат на 3 часа при температуре +37°C, после чего к содержимому пробирок добавляли по 1 капле 0,1% раствора Люголя. В случае обнаружения слюны раствор приобретает желтоватое окрашивание (положительный результат), в случае отсутствия слюны раствор остается окрашенным в синий цвет.

Методика определения слюны на вещественных доказательствах по амилазной активности в агаре (по Федоровцеву А.Л., 1998).

Для проведения реакции на предметные стекла наносят равномерный слой толщиной 1 мм расплавленного на водяной бане 1% раствора агара, приготовленного на 2% растворе картофельного крахмала на физиологическом растворе (2 г картофельного крахмала, 1 г агара, 100 мл физиологического раствора). Участки предмета-носителя весом 1-5 мг или смывы маленьким кусочком марли, смоченной физиологическим раствором, с участков предмета-носителя, где предполагается наличие слюны, в течение 1 часа экстрагируют несколькими каплями физиологического раствора при комнатной температуре. По одной капле экстракта, контрольной вытяжки из предмета-носителя и заведомой слюны, разведенной физиологическим раствором в 500-1000, раз вносят в лунки диаметром 3-5 мм, сделанные в крахмально-агаровом геле на предметных стеклах на расстоянии 1-1,5 см друг от друга, и инкубируют во влажных камерах в течение 2-3 часов при температуре 37°C. Затем стекла погружают в раствор Люголя. При этом крахмально-агаровый слой окрашивается в темно-синий цвет, а вокруг лунок с вытяжками, в которых имеется слюна (т.е. где высокая амилазная активность), остаются неокрашенные участки в виде колец просветления, ширина которых зависит от количества амилазы в вытяжке. При отрицательном результате реакции на амилазу в исследуемых объектах, такое кольцо просветления-имеется только в лунке с контрольным образцом слюны [84].

Для установления наличия слюны на различных объектах активно применяются высоко чувствительные иммунохроматографические тесты (кассеты, стрипы), основанные на выявлении α -амилазы человека, с помощью двух типов моноклональных антител мыши, специфичных к указанному ферменту.

Иммунохроматографический анализ. Вырезки из пятен размерами 0,2×0,2 см или смывы из исследуемых пятен помещают в пробирки, экстрагируют буферным раствором при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем, используя одноразовую пипетку, 10 мкл вытяжки с буфером помещают на тестовое поле кассеты (стрипа). Положительный результат: после экспозиции в течение 10 минут образование двух полос красноватого цвета: полосы контроля (С) и полосы положительного результата на наличие слюны человека (Т) в исследуемых вытяжках. Отрицательный результат: после экспозиции в течение 10 минут образование только одной полосы

контроля (С), полоса положительного результата на наличие слюны человека (Т) отсутствует.

В зарубежной судебно-медицинской экспертной практике для обнаружения слюны помимо иммунохроматографического анализа, применяют и другие современные методики. В частности, используют визуальный тест на уринарную амилазу, тест на амилазу по Фадебазу, специальные тест-полоски (стрипы), меняющие свою окраску при наличии амилазы в исследуемых вытяжках, кинетический метод, которые основаны на объективной количественной регистрации амилазы в исследуемых вытяжках [90, 95, 98, 101, 103].

В настоящее время существуют тест-наборы для клинических (диагностических целей) по определению уровня α -амилазы в биологических жидкостях, предназначенные для биохимических анализаторов, где все исследования и измерения выполняются в кварцевых кюветах. На основе одного из таких наборов в нашей стране была разработана и апробирована методика установления наличия слюны в пятнах на вещественных доказательствах с помощью определения активности α -амилазы в биологических жидкостях в полистирольных 96-луночных планшетах с плоским дном с объективной регистрацией результатов [64]. Принцип этой методики заключается в том, что α -амилаза гидролизует CNP-олигосахарид с образованием CNP (2-хлор-4-нитрофенола). Скорость образования CNP прямо пропорциональна активности α -амилазы в исследуемой пробе. Ее количество измеряется фотометрически на ридере при длине волны 405 нм. Реакцию осуществляют следующим образом. Вырезки из следов экстрагируют дистиллированной водой в течение 18 часов в условиях бытового холодильника. В лунки полистирольного планшета многоканальным дозатором вносят по 5 мкл вытяжек из образцов и контрольных проб, раскапывали в лунки с субстратом. Добавляют в каждую лунку с внесенными пробами и образцами по 200 мкл реагента. Пробы инкубируют в термошейкере в течение 1 минуты. Учет полученных результатов производят фотометрически измерением оптической плотности опытных и контрольных проб при длине волны 405 нм ридером с соответствующим программным обеспечением. При получении положительного результата пробы окрашиваются в желтовато-коричневый цвет, и их оптическая плотность

составляла от 0,1 до 3,0 условной единицы, в зависимости от количества амилазы.

Групповую принадлежность слюны устанавливают с помощью различных модификаций РАЭ и вариантов дот-ИФА. Половую принадлежность слюны устанавливают судебно-цитологическим методом по X-хроматину и Y-хроматину в ядрах буккальных клеток.

8.2. Установление наличия мочи

Наличие мочи в подозрительных следах определяют по присутствию мочевины или креатинина.

Установление наличия мочи по креатинину. Кусочки (вырезки) ткани (смывы на ниточки марли) из области пятен, контрольных участков предмета-носителя и кусочков марли, пропитанных мочой, помещают в толуол (для предотвращения перехода в вытяжку красителей и окрашенных загрязнений с вещественных доказательств). Через 5 минут толуол удаляют, а к исследуемому материалу добавляют 2% раствор уксусной кислоты с незначительным избытком. Содержимое пробирок нагревают 3 мин с небольшими перерывами, не доводя до кипения. После чего жидкость из каждой пробирки переносят в чистые пробирки, охлаждают до комнатной температуры и добавляют по 6 капель 10% раствора едкого натра и по 10 капель 1% водного раствора нитропрусида натрия. После перехода получившегося красно-оранжевого окрашивания в желтое, добавляют по 10 капель ледяной уксусной кислоты и кипятят еще 10 минут с небольшими перерывами. Положительный результат – появление сине-зеленого окрашивания жидкости, находящейся в контакте с пятном мочи и исследуемым материалом.

Установление наличия мочи по мочеине методом тонкослойной хроматографии. Кусочки (вырезки) (смывы на ниточки марли) из пятен на вещественных доказательствах и контрольных участков предмета-носителя, экстрагируют дистиллированной водой в течение 20 часов в условиях холодильника при температуре +4°C. В качестве контроля используют образец заведомой мочи. Вытяжки центрифугируются и пятикратно наслаиваются на стартовую линию силуфоловой пластины, которую помещают в камеру с универсальным растворителем состава: бутанол, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода в соотношении 4:1:2, после приближения фронта

растворителя к противоположному концу, пластину просушивают в течение 10 минут при температуре +60°C и обрабатывают 1% раствором парадиметиламинобензоальдегида в 10% растворе соляной кислоты. Положительный результат – зона желтого окрашивания, характерная для мочевины, появляется на полосе с вытяжкой из пятна заведомой мочи, взятым для контроля $R_f \approx 0,3$.

Для установления наличия следов мочи на различных объектах также применяется метод иммунохроматографического анализа: высоко чувствительные и специфичные иммунохроматографические тесты, основанные на использовании АТ к белку Гамма-Хорсфалла.

Практически вид мочи не устанавливают из-за отсутствия в ней достаточного количества белка. Группоспецифические антигены системы АВ0 в следах мочи выявляют реакцией абсорбции-элюции в разных ее модификациях.

8.3. Установление наличия пота

В связи с отсутствием строго специфической реакции на установление наличия пота исследование последнего (методом хроматографии в тонком слое сорбента или химическими реакциями) целесообразно производить в случаях: установления принадлежности предмета (объекта) определенному лицу, изучения пальцевых отпечатков, установления природы влияния предмета-носителя на сыворотки. Исследование пота на спичках, в подногтевом содержимом, на окурках проводить не рекомендуется из-за большой вероятности получения неспецифических результатов.

Если эксперту нужно выявлять присутствие пота на каких-либо носильных вещах, то в подобных случаях к выводу о присутствии пота следует подходить путем исключения наличия в этом пятне слюны, спермы или мочи.

Устанавливать наличие пота на длительно ношенных предметах (подкладке головных уборов, стельках обуви, носках, чулках и др.) нецелесообразно.

Доказательным методом на наличие пота является реакция на аминокислоту серин, содержащуюся в нем в значительном количестве. Реакция на серин достаточно чувствительна, причем положительный результат может быть получен при исследовании 5-10 мг материала со свежими и 15 мг – со старыми пятнами пота. В настоящее время в

практической работе используется хроматографический метод. Метод определения пота с применением хроматографической кислоты в связи с большей трудоемкостью в настоящее время вышел из употребления [46].

Метод хроматографии. Для установления наличия пота в настоящее время широко используют и метод хроматографии силуфолевых пластинок. В основе этого метода также лежит выявление аминокислоты серина. Наиболее распространенной системой растворителей при хроматографии вытяжек из пятен пота является смесь бутанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 4:1:2. Для проявления аминокислот, в том числе и серина, имеющего $R_f=0,23$, используют 1% спиртовой раствор нингидрина, который окрашивает участки серина в розово-фиолетовый цвет. Хроматографическое исследование вытяжек из пятен на наличие в них пота обязательно проводят с введением в хроматограмму контрольного образца аминокислоты серина. Хроматография проводится в течение 20-60 минут. Заключение о наличии пота может быть дано либо на основании цветовой реакции, либо при исключении наличия на вещественных доказательствах других выделений.

Вид пота устанавливают чрезвычайно редко и лишь при особых обстоятельствах (возможность присутствия пота какого-либо животного). Для этой цели используют метод встречного иммуноэлектрофореза.

Групповые свойства пота устанавливают методом абсорбции-элюции в разных модификациях. Для решения вопросов о группе пота в смешанных следах (например, кровь и пот) используют экстрагирование материала в бутаноле или в смеси бутанола с метанолом.

8.4. Установление наличия спермы

Для предварительного (ориентировочного) установления наличия спермы в следах и участках на вещественных доказательствах, используют исследование в ультрафиолетовых лучах (пятнам спермы свойственно голубовато-белое свечение), применяют фитоагглютинационный способ (положительный результат – задержка агглютинации) и реакцию на общую кислотную фосфатазу (КФ) с применением тестирующих полосок (при положительном результате полоска приобретает сиреневый цвет).

В зарубежной судебно-медицинской практике для ориентировочного установления наличия спермы используют высокочувствительные

колориметрические методы в различных модификациях [92, 94, 99, 100]. Для ориентировочного установления наличия спермы в следах и участках на вещественных доказательствах по КФ в нашей стране был разработан вариант колориметрического метода [63].

Принцип метода заключается в том, что субстрат 1-Нафтил фосфат гидролизуется КФ и переходит в 1-Нафтол, который преобразуется в устойчивый комплекс и способен к окрашиванию. При измерении оптической плотности окрашенного комплекса, увеличение абсорбционной способности при длине волны в 405 нанометров пропорционально активности общей кислой фосфатазы в исследуемом образце. Простатическая КФ блокируется тартратом и может быть определена путем вычисления разности в активности общей КФ и активности КФ, оставшейся после подавления простатической КФ ингибитором (тартратом). Измерение оптической плотности производится в 96 луночных прозрачных полистирольных планшетах с плоским дном с помощью медицинского микропланшетного ридера с программным обеспечением при длине волны 405 нм, что значительно увеличивает производительность данной методики.

Преимущество этого метода перед широко распространенными в настоящее время в судебно-медицинской экспертной практике ориентировочными методиками определения КФ на вещественных доказательствах, состоит в том, что он позволяет отделить простатическую КФ от общей КФ. Общая КФ может быть обнаружена на вещественных доказательствах за счет присутствия на них слюны, влагалищных выделений, крови, сока растений, а также за счет загрязнения их бактериальными ферментами, простатическая КФ содержится только в сперме.

Методика исследования.

Пробоподготовка образцов. Вырезают фрагмент из объекта размерами 0,5×0,5 см, либо несколько вырезок из участка размерами 10×10 см, подозрительного на присутствие спермы, а при необходимости и контрольного участка предмета-носителя (в зависимости от тактики экспертного исследования, характера и величины следов), на котором требуется установить наличие спермы, заливают минимальным необходимым (без избытка) объемом дистиллированной (лучше деионизированной) воды с Ph=7,2-7,4 (соответствует Ph сыворотки крови человека). Экстрагируют при температуре 4°C от 18 до 24 часов. В качестве положительного контроля можно использовать экстракты из высушенной на марле спермы человека в

разведении 1:100 и 1:1000. Отрицательный контроль - жидкая слюна человека в разведении 1:2; 1:1. Данный отрицательный контроль позволяет убрать влияние слюны и влагалищных выделений, в которых может содержаться незначительное количество общей КФ, а также частично влияние простатической КФ сыворотки крови при исследовании насыщенных кровяных пятен. Он готовится таким образом, чтобы его оптическая плотность при измерении составляла 0,05-0,06 условных единиц.

Ход работы:

1. Приготовление отрицательного контроля (жидкая слюна в разведении 1:2; 1:1) и положительного контроля (вытяжка из высушенной на марле спермы, разведенная 1:100, 1:1000).

2. Внесение в лунки А1 и В1 полистирольной планшеты с плоским дном (можно стрипованной, можно нет) по 10 мкл отрицательного контроля, а в лунки С1 и D1 по 10 мкл положительного контроля. Внесение во все остальные лунки (по порядку) по 10 мкл исследуемых вытяжек.

3. Внесение во все занятые контролями и исследованным материалом лунки по 100 мкл буфера на общую КФ.

4. Инкубация в течение 3-5 минут на шейкере-термостате при температуре +37°C (интенсивность перемешивания 600-650 об./минуту).

5. Регистрация результатов реакции фотометрически на ридере при длине волны 405 нм с трехминутным интервалом (кинетика), введение результатов в компьютер.

6. Распечатка результатов.

7. Проверка вытяжек, в которых получены положительные результаты на присутствие общей КФ, на наличие ингибиции с тартратом. В лунки полистирольного планшета вносят по 10мкл вытяжек. Затем в вышеуказанные лунки вносят по 100 мкл буфера, содержащего тартрат, приготовленного по инструкции. Затем инкубируют на шейкере и снимают показания на ридере, как было описано выше. Если фосфатаза в исследуемых вытяжках простатическая, а не общая, то мы будем наблюдать выраженную ингибицию (значение оптической плотности с тартратом будет в 3-10 раз меньше, чем с буфером, предназначенным для измерения общей КФ).

8. Исследование материала, в котором обнаружена простатическая КФ, доказательными методами на наличие спермы (морфологическими методами – поиск целых сперматозоидов, либо их головок; иммунологическими методами – на наличие ПСА и семиногелина человека).

Оценка результатов. Компьютерную программу для ридера следует написать так, чтобы отсечка (начало учета положительного результата) шла от значения в 1,5 большего средней оптической отрицательных контролей. Принцип подсчета и обработки результатов реакции заключается в следующем: исходят из отрицательных контролей, находящихся в лунках А1 и В1 (жидкая слюна человека, разведенная 1:1 или 1:2). В данных лунках определяют оптическую плотность, которая должна находиться в пределах 0,05-0,06 условных единиц, после чего полученные значения усредняются (складываются и делятся пополам) и умножаются на 1,5 (это осуществляется на компьютере с помощью программного обеспечения). Вышеуказанная процедура служит основой для последующего определения положительного, либо отрицательного результата в исследуемых пробах, полученных с объектами на вещественных доказательствах. Положительный контроль (вытяжки из высушенной на марле спермы человека, разведенные 1:100, либо 1:1000), в котором должны быть достаточно большие показатели оптической плотности (0,5-2,5) указывает на то, что методика работает правильно. Следовательно, все, что больше или равно усредненным отрицательным контролям, умноженным на 1,5 по значению оптической плотности должно отмечаться как (+), а все что меньше – как (-). Таким образом, если при исследовании вытяжки из исследуемого объекта на вещественном доказательстве получен положительный результат «+», то это свидетельствует о присутствии либо общей, либо простатической КФ на данном вещественном доказательстве (их разделяют путем дальнейшего исследования).

Для доказательного обнаружения сперматозоидов и компонентов семенной жидкости применяют морфологический метод (с разнообразными способами окраски сперматозоидов), метод концентрированного извлечения сперматозоидов (по Серопяну), иммунохроматографический анализ: тесты (стрипы) на семиногелин человека, на простатоспецифический антиген, количественный твердофазный иммуноферментный анализ.

В настоящее время к одним из перспективных и высокотехнологичных методов обнаружения спермы можно отнести и количественный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Этот метод установления наличия спермы на вещественных доказательствах основан на выявлении простатического специфического антигена человека. Простатический специфический антиген человека (ПСА) является белком, который продуцирует только человеческая простата. Это обстоятельство позволяет

использовать его для обнаружения спермы и, одновременно, установления ее видовой принадлежности. Указанный АГ присутствует в семенной жидкости даже в случаях полной азооспермии, что позволяет доказательно устанавливать наличие спермы на вещественных доказательствах в тех случаях, когда морфологическими методами этот факт установить невозможно.

Впервые технология обнаружения ПСА методом ИФА для установления наличия спермы в тампонах с содержимым влагалища была предложена в Бельгии [97]. Несколько позже ряд исследователей из США доказали, что метод ИФА для обнаружения ПСА можно с успехом использовать при установлении наличия спермы не только в тампонах с содержимым из влагалища, полости рта и прямой кишки, но и в пятнах на вещественных доказательствах [96]. В нашей стране был разработан вариант количественного твердофазного иммуноферментного анализа в виде усовершенствованной медицинской технологии, с внесением ряда существенных изменений в пробоподготовку, что позволило повысить его доказательность [62]. Метод предназначен для определения ПСА-общего (в сыворотке крови человека есть как связанная с белком-переносчиком, так и свободная фракции ПСА). Свободная фракция активна и имеет важное диагностическое значение, в частности, если свободного ПСА в сыворотки крови больше нормы, это говорит о злокачественных процессах в простате. Метод позволяет измерить суммарно как свободный, так и связанный ПСА, то есть общий. Принцип метода заключается в том, что в результате количественного твердофазного ИФА образуется специфический иммунный комплекс с использованием иммобилизованных ПСА – АТ и моноклональных ПСА – антител, меченых пероксидазой. Исследуемый ПСА в результате анализа оказывается, как бы «зажатым» между молекулами иммобилизованных и меченых АТ, что послужило поводом для широкого распространения в литературе названия этого метода, как «сэндвич»-метод (англ. sandwich). В литературе встречается и другое его название – двуцентровой метод ИФА (англ. two-site assay). Данный комплекс выявляется посредством окраски с помощью рабочего раствора тетраметилбензидина, после чего в лунки полистирольного планшета вносят стоп-реагент. Регистрация результатов реакции осуществляется фотометрически на регистрирующем приборе при длине волны 450 нм с введением результатов в компьютер.

Пробоподготовка образцов. Вырезают фрагмент предмета-носителя (размеры могут быть от 0,5×0,5 см, до концентрирования нескольких вырезок с участка 10×10 см, в зависимости от тактики экспертного исследования, характера и величины следов), на котором требуется установить наличие спермы, заливают минимальным необходимым (без избытка) объемом дистиллированной (лучше деионизированной) воды с РН=7,2-7,4 (как в сыворотке крови человека). Экстрагируют при температуре 4°С от 18 до 24 часов. Затем экстракт переносят в чистую центрифужную (микроцентрифужную) пробирку и разводят 1:50. Этот этап необходим, поскольку ПСА человека содержится в сыворотке крови и влагалищных выделениях. Указанное разведение вытяжек исключает ложноположительный результат. Поскольку методика высоко чувствительна (положительный результат был получен при разведении экстрактов из высушенной на марле спермы в 1:10000), то даже данное разведение эффективно при исследовании не только малонасыщенных пятен, но и невидимых глазом следов. В качестве контроля можно использовать экстракты из высушенной на марле спермы человека в разведении 1:1000. Остальные необходимые контроли и калибровочные пробы имеются в тест-наборе.

Ход работы. Данный метод реализовывался в следующей последовательности действий:

1. Внесение в лунки полистирольного планшета по 20 мкл исследуемых, калибровочных и контрольных проб, а также по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

2. Инкубация в течение 1 часа на шейкере-термостате при температуре +37°С (интенсивность перемешивания 600-650 об./минуту).

3. Промывание фосфатно-солевым буфером с Ph – 7,2-7,4 (0,1 г. КСl, 4 г. NaCl, 0,1 г. КН₂РO₄, 1,1 г. Na₂НРO₄ × 7Н₂O или 0,55 г Na₂НРO₄; долить до 500 мл дистиллированной или деионизированной водой. К 1 л фосфатно-солевого буфера добавить 0,5 мл детергента (Твин-20 или Тритон X-100) 5 раз на вошере (либо вручную) и полное удаление жидкости.

4. Внесение в лунки полистирольного планшета по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина (субстратный раствор тетраметилбензидаина) представляет собой бесцветную жидкость на основе стабилизированного буферного раствора, содержащего 3,3',5,5' - тетраметилбензидаина гидрохлорида и перекись водорода; субстратный раствор полностью готов к использованию и не требует каких-либо добавок).

5. Инкубация 10-15 минут при температуре +37°C на шейкере-термостате (интенсивность перемешивания 400-500 об./мин.), либо при комнатной температуре 15-30 минут.

6. Внесение в лунки полистирольного планшета по 100 мкл стоп-реагента (HCl соляная кислота).

7. Регистрация результатов реакции фотометрически на ридере при длине волны 450 нм.

Оценка результатов. Компьютерную программу для ридера (программное обеспечение продается вместе с прибором, под каждый тест-набор пользователь сам или с помощью инженера-программиста составляет программу, исходя из инструкции к нему) следует написать так, чтобы отсечка шла от минимальной положительной калибровочной пробы. Принцип калибровочного подсчета заключается в следующем: берется шесть прилегающих к набору калибровочных проб – образцов с заведомо известной концентрацией ПСА (например: 0 нг/мл; 1,05 нг/мл; 2,5 нг/мл; 5 нг/мл; 10 нг/мл, 31,5 нг/мл). Затем определяют в них оптическую плотность, после чего по шести точкам строят калибровочную кривую (это осуществляется на компьютере с помощью программного обеспечения). Данная кривая служит основой для последующего определения концентрации ПСА в исследуемых пробах, полученных с вещественных доказательств. Все, что больше или равно пробе с концентрацией 1,05 нг/мл по значению оптической плотности должно отмечаться как (+), а все что меньше – как (-). Таким образом, если при исследовании вытяжки из предмета-носителя, разведенной 1:50 дистиллированной (деионизированной) водой получен положительный результат «+», то это свидетельствует о присутствии спермы человека на исследуемом вещественном доказательстве.

8.5. Установление групповой принадлежности выделений

Групповую принадлежность выделений устанавливают с помощью различных модификаций РАЭ, КРА, КРАЭ и вариантов дот-ИФА.

Выявление АВН и Lewis антигенов в выделениях человека, с помощью дот-ИФА. Методом дот-ИФА выявляют антигены А, В, Н, Le^a, Le^b в пятнах выделений человека, т.е. определяют группы крови и категории выделительства. В специальном наборе моноклональные мышиные АТ против АВН и Lewis АГ человека: анти-А - А-91/27, анти-В - В-85/2, анти-Н - Н-89/8, анти- Le^a - 3D3/98, анти- Le^b C5/93 конъюгированы с пероксидазой хрена, что

позволяет проводить иммуноферментный анализ в одну стадию и значительно сокращает время и упрощает саму процедуру тестирования. В качестве субстрата используется раствор 4-хлор-1-нафтола, который при окислении образует темно-синий нерастворимый осадок. Высокая чувствительность метода дает возможность получать надежные результаты при анализе следовых количеств слюны, спермы и влагалищных выделений и пота.

Ход работы. Достать с помощью пинцета из чашки Петри пять квадратов нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ). Каждый квадрат НЦМ расчерчен на 9 клеток и рассчитан на одновременный анализ 9 образцов. В верхнем левом углу каждого из пяти квадратов сделать пометку простым карандашом А, В, Н, Le^a, Le^b для ориентировки. Образец (надосадочную жидкость) развести раствором № 4 в соотношении 1:1 (20 мкл образца + 20 мкл раствора № 4) в 96-луночном планшете и нанести по 5 мкл на каждый из пяти квадратов НЦМ. Например, 5 мкл образца № 1 поместить в первую клетку первого квадрата НЦМ, помеченного как А, затем следующие 5 мкл образца № 1 поместить в первую клетку второго (В) квадрата НЦМ, следующие 5 мкл образца № 1 поместить в первую клетку третьего (Н) квадрата НЦМ и т.д. до пятого квадрата. 5 мкл образца № 2 поместить во вторую клетку первого квадрата НЦМ, затем – во вторую клетку второго квадрата НЦМ, затем во вторую клетку третьего квадрата и т.д. до пятого квадрата. Образец № 3 поместить в третью клетку первого квадрата НЦМ и т.д. до пятого квадрата. Подобным образом разместить все исследуемые образцы. При исследовании следов спермы и влагалищных выделений квадраты мембраны с нанесенными образцами прогреть в дистиллированной воде на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Пять лунок 6-луночного планшета промаркировать А, В, Н, Le^a и Le^b. В промаркированные лунки внести по 2700 мкл раствора № 1, после чего добавить по 300 мкл ~ АТ анти-А, анти-В, анти-Н, анти- Le^a и анти- Le^b в лунки с соответствующей маркировкой, используя для каждого раствора АТ новый наконечник. Квадраты НЦМ с нанесенными образцами поместить в соответствующие лунки с АТ (по 1 квадрату в каждую лунку). Также в лунки с анти-А, анти-В, анти-Н АТ поместить по 1 полоске контрольных образцов А, В, Н, АВ (на полоске образцы расположены слева направо – левый угол срезан), в лунку с анти- Le^a антителами – контрольный образец Le^a, а в лунку с анти- Le^b – одну контрольную полоску А, В, Н, АВ, т.к. это образцы выделителей.

Инкубировать планшеты в течение 30 минут на ротационном шейкере со скоростью вращения 300 об./минуту при комнатной температуре. Все последующие процедуры проводятся также при комнатной температуре. Раствор из лунок удалить с помощью пипетки или водоструйного насоса. В каждую лунку добавить по 3,0 мл раствора № 1 и встряхивать на шейкере в течение 10 минут. Затем раствор удалить и повторить отмывку раствором № 1, раствор удалить. Далее в каждую лунку добавить по 3,0 мл раствора № 2 и встряхивать на шейкере 10 минут, раствор удалить. В каждую лунку планшета добавить по 3,0 мл субстратного раствора. Инкубировать при встряхивании на шейкере в течение 30 минут. По окончании инкубации субстратный раствор удалить. Добавить в каждую лунку по 4-5 мл дистиллированной воды и инкубировать на шейкере в течение 10 минут. Мембраны с образцами и контролями извлечь из лунок, поместить в том же порядке на фильтровальную бумагу и высушить (при необходимости подновить карандашные пометки). Промытые в дистиллированной воде и высушенные нитроцеллюлозные мембраны можно хранить в течение нескольких месяцев.

Учет результатов. В зонах локализации ферментативной активности образуется нерастворимый темно-синий осадок, что свидетельствует о наличии в исследуемом образце соответствующего АГ – положительный результат. При отрицательном результате окрашивания не происходит. Интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Заключение о групповой принадлежности и категории выделительства делают в случае правильных результатов реакции с контрольными.

Методика установления групповой принадлежности изолированных сперматозоидов методом РИФ в количественной в настоящее время в практической работе не применяется ввиду прекращения производства в Российской Федерации производства флюоресцирующих сывороток [59, 61].

9. ЭКСПЕРТИЗА ВОЛОС

9.1. Стандартный алгоритм проведения экспертизы сходства-различия волос

Стандартный алгоритм проведения экспертизы сходства-различия волос лиц, проходящих по делу, включает следующие этапы исследования [33]:

- макроскопический осмотр объектов, представленных на экспертизу;
- морфологическое исследование волос-образцов методами макро- и микроскопии;
- морфологическое исследование волос-улик методами макро- и микроскопии;
- сопоставление морфологических признаков волос-улик и волос-образцов по сводным описаниям;
- сравнительное исследование морфологических признаков волос-улик и волос-образцов методами макро- и микроскопии;
- оценка сравниваемых морфологических признаков волос и анализ результатов сравнительного исследования;
- установление групповой принадлежности волос-улик по системе АВО с помощью РАЭ и РСА;
- установление половой принадлежности волос-улик цитологическим методом (по Y-хроматину и по X-хроматину, исследуются экспертами-цитологами);
- формулирование выводов о сходстве или несходстве волос;
- составление заключения эксперта.

Очередность ряда этапов представленного алгоритма проведения экспертизы сходства-различия волос может меняться в зависимости от экспертной тактики. Выбор тактики обусловлен тем, как представлены волосы-улики: в виде пучка (при одинаковой ориентации корневых концов и однотипном механизме отделения), группами неупорядоченных волос (россыпью, не менее 5 штук) или одиночными.

Основными морфологическими методами исследования волос являются макроскопическое и микроскопическое исследования.

9.2. Основные этапы исследования волос, представленных на экспертное исследование

При макроскопическом исследовании изучают следующие признаки волос: цвет, форму, длину, особенности (наложения, повреждения).

При микроскопическом исследовании волос-улики и волосы-образцы осматривают под малым увеличением в «сухом виде». Затем волосы просветляют с помощью одного из указанных веществ: ксилола, бензола, скипидара, глицерин-вазелинового масла, смеси глицерина с этанолом (1:1), дистиллированной воды, после чего вновь подвергают микроскопии.

Сначала волос исследуется по всей длине на малом увеличении (объектив $\times 8$, окуляр $\times 10$), при этом отмечают форму стержня, фон коркового вещества, его насыщенность пигментом; оценивают распределение пигмента по длине и толщине ствола, изменение его характеристик на протяжении волоса; отмечают наличие сердцевинки, ее характер и расположение, толщину в долях от ширины ствола и имеющиеся особенности; оценивают характер корневого и периферического концов, общую специфику волоса (узлы, перекруты, повреждения, признаки заболеваний и т.п.).

Затем волос исследуют на большом увеличении ($\times 40$) и детально изучают слои волоса: подробно отмечают особенности основных морфологических признаков кутикулы, коркового вещества, пигмента и сердцевинки, прослеживают изменения на всем протяжении волоса.

Все выявленные при исследовании макро- и микроскопические характеристики волос описывают по определенной схеме в рабочем журнале или вносят в специальную таблицу.

Между собой сравнивают только однотипные группы волос, то есть волосы головы – с волосами головы, региональные волосы – с волосами-образцами того же региона.

Если в процессе изучения волос эксперт пришел к выводу, что эти волосы принадлежат животному, он далее не обязан решать вопрос о виде этого животного, так как это входит в компетенцию эксперта-криминалиста.

9.3. Экспертное исследование морфологических признаков волос

Исследование морфологических признаков волос производится по следующей схеме:

1. Длина: указывают наименьшую и наибольшую длину волос в группе и каждого волоса из россыпи в см.

2. Толщина: указывают значения наименьшей и наибольшей максимальной толщины и среднее значение максимальной толщины в группе волос.

3. Форма: прямой, изогнутый, дугообразный, волнистый (мелко-, крупно-), извитой, курчавый.

4. Цвет: единичных волос – черный, коричневый, красный, желтый, серый, белый. Эти основные цвета могут быть дополнены характеристикой их интенсивности (светло-, темно-), они могут нести черты переходного цвета (серо-коричневый, красно-коричневый), кроме того, указывают изменение цвета волоса на протяжении (со светлым периферическим, с темным корневым концом). Цвет волос в пучке характеризуют как: белокурый, русский (с оттенками), седой (с проседью), рыжий.

5. Кутикула: в виде едва различимого, хорошо заметного, выраженного, утолщенного, разволокненного, бесцветного, серебристо-серого, желтоватого, сероватого тяжа; оптический край ровный, в основном волнистый, местами зубчатый; зубцы не различимы, едва заметны, мелкие, средней величины, хорошо выражены, крупные; с различной степенью плотности, за исключением верхушек, на всем протяжении, в корневом, в периферическом отделе, на отдельных участках, местами, единичные, прилегают к стволу волоса, чуть, едва, незначительно, отогнуты; неравномерно сближены; рисунок линий кутикулы простой, средней сложности, с тенденцией к упрощению, сложный; варьирует на протяжении волоса, однообразен; линии далеко отстоят друг от друга, неравномерно отдалены, резко сближены, местами сближены местами отдалены, образуют обширные поля без рисунка; едва, мелко-, крупно зазубрены; слегка (сильно) волнисты, почти параллельны, наклонены, переплетаются, образуют зигзаги, серии клиновидных, языкообразных выступов. Рисунок кутикулы характерен для волос человека и относится к рисунку описанной выше сложности.

6. Корковое вещество: фон (цвет, оттенок) серовато-, красновато-коричневый, светло-, темно-, ярко-желтый, серый; на всем протяжении, в __ см от корневого, периферического конца; пигмент пылевидный, мелко-, среднезернистый, (чрезвычайно) мелкие, средних размеров, хорошо (отчетливо) выраженные зерна светло-, темно-коричневого пигмента; расположение пигмента по типу диффузного, выраженных скоплений не образует, образует скопления в виде мелких, крупных глыбок, черточек, цепочек, полос, нежных, грубых, рыхлых, плотных, (не) выраженных, насыщенных, мелких, крупных мазков, тяжей, придавая волосу пятнистый, полосатый вид; на протяжении волоса картина пигмента (не) меняется, в __ см

от корня, становится более светлым, темным, менее (более) контурированным, смазанным, расплавленным, выраженным; расположение по толщине равномерное, периферическое, центральное, больше на одной половине ствола, с преобладанием по периферии, по длине - равномерное, меньше (больше) в корневом, периферическом отделе, у обоих концов; пигментофоры округлой, овальной, вытянутой формы; мелкие, средних размеров, крупные; (без) с отростками, плотные, слоистые, распадающиеся; количество – единичные, мало, умеренно, много, располагаются группами, цепочками, поодиночке, расположены по толщине равномерно, центрально, периферически, по длине равномерно, больше (меньше) в корневом, в периферическом отделе; особенности коркового вещества – наличие мелких, крупных, единичных, множественных, группирующихся, сливающихся щелевидных трещин, округлых пустот, расположенных по толщине равномерно, центрально, периферически, по длине – на отдельных участках, в корневом, в периферическом отделе, хорошо выражена продольная исчерченность.

7. Сердцевина: отсутствует на всем протяжении, в корневом, в периферическом, в среднем отделе, представлена непрерывным, прерывающимся тяжом, составляет $1/3$, $1/7$ часть толщины волоса, встречается в виде отдельных островков, отломков щепы; повторяет форму стержня, контуры ее неровные, структура не различима, состоит из плотно, рыхло расположенных мелких округлых клеток; есть участки с двойной сердцевинной, элементы двойной сердцевинной; расположена центрально, местами эксцентрично.

8. Корневой (центральный) конец: по толщине не отличается от других отделов, расширен в поперечнике, расщеплен (метлообразно, на несколько частей), раздвоен, разволокнен, в виде кисточки; имеет поперечное (косое, скошенное) сечение; поверхность отделения ровная, шиловидная, мелко-, средне-, крупнобугристая, ступенеобразная, имеет выступы, выемки, трещины; края острые, закругленные, сглаженные.

9. Луковица: (слегка) колбовидная с неровной поверхностью, поверхность в виде лимонной корочки, нижний полюс лимонообразно заострен, закруглен, есть вдавление для волосяного сосочка, клетки ороговевшие, лишены ядер и пигмента, влагалищные оболочки отсутствуют, сохранены единичные ороговевшие чешуйки, вблизи луковицы сохранены остатки наружных влагалищных оболочек; луковица истончена, деформирована, в виде

крючка, слегка перекручена, с оторванной нижней частью, остатки луковицы богаты клеточными элементами и пигментом, влагалищные оболочки мягкие, гибкие, гофрированные, хорошо выражены, вырваны вместе с частью дермы, покрыты кровью, складчато завернуты над прикорневой частью, имеют вид «спущенного чулка», имеются лишь обрывки влагалищных оболочек, свободные края клеток кутикулы подвернуты внутрь (книзу), смяты, в виде нежной волнистой прозрачной вуали; луковица в форме клина с закругленным углом («сломанный карандаш»).

10. Периферический конец (верхушка): игловидно истончен, истончается на протяжении, по толщине не отличается от других отделов, расширен; закруглен (зашлифован сферически), расщеплен (метлообразно, на несколько частей), разволокнен, в виде кисточки; имеет поперечное (косое, скошенное) сечение; поверхность отделения ровная, шиповидная, мелко-, средне-, крупнобугристая, ступенеобразная, имеет выступы, выемки, трещины; края острые, закругленные, сглаженные.

Исследование поперечных срезов волос производится в следующей последовательности:

1. Форма.
2. Величина.
3. Цвет коркового вещества (для окрашенных, обесцвеченных волос).
4. Цвет и характер пигмента.
5. Расположение пигмента.
6. Ширина кутикулы.
7. Цвет кутикулы (для окрашенных и обесцвеченных волос).

9.4. Сравнительное экспертное исследование волос

Сравнительное исследование волос проводят как макроскопически, так и микроскопически на малом (10^x) и на большом (40^x) увеличении, наблюдая волосы из разных групп, рассматривая их в одном поле зрения.

В ходе сравнительного исследования, сначала волосы-улики сравнивают между собой для решения вопроса об их сходстве или различии по морфологическим признакам, и, соответственно, о возможности их происхождения от одного или нескольких лиц.

Затем волосы-улики сравнивают со сходными по групповой характеристике с образцами волос для решения вопроса о возможности их происхождения от конкретного лица.

Не сходные по группе образцы волос не подвергают сравнительному исследованию из-за его нецелесообразности (происхождение волос с места происхождения от человека с другой групповой принадлежностью исключается уже на этом этапе). Признаки сходства между сравниваемыми объектами перечисляются без детализации схожих характеристик.

Признаки различия между сравниваемыми объектами следует перечислять с указанием сути различия и с применением сравнительных форм (больше/меньше, темнее/светлее, мельче/крупнее и т.п.).

9.5. Установление групповой принадлежности волос реакцией абсорбции-элюции

Групповую принадлежность волос предпочтительнее устанавливать в РАЭ с применением изогемагглютинирующих сывороток анти-А, анти-В или моноклональных сывороток анти-А, анти-В и анти-Н в титре 1:128. Для определения групповой принадлежности волос подбор титра диагностических реагентов (при микроучете 1:128) и выбор тест-эритроцитов (с максимальной агглютинабельностью) должны быть выполнены особенно тщательно, с обязательным соблюдением техники и условий, которые будут применяться на конечном этапе исследования.

Перед выявлением групповых факторов в волосах-уликах необходимо проверить активность и специфичность диагностических реагентов в РАЭ с волосами-образцами, представленными по делу для сравнения, и с коллекционными образцами волос всех групп. Активность сывороток α (анти-А) необходимо проверить с разными образцами волос группы АВ, среди которых обязательно должен быть невыделитель. Введение такого образца необходимо, так как АГ А в группе АВ невыделителей выявляется особенно сложно и, чтобы его открыть необходимо применить особые параметры реакции, повышающие ее активность.

Одновременно с подбором диагностических реагентов определяют оптимальные размеры фрагментов волос. Чтобы обеспечить одинаковое количество выявляемого АГ во всех вводимых в реакцию волосах, необходимо, чтобы толщина, количество и длина волос были такими же, как у фрагментов

волос-улик в основном опыте. Если толщина исследуемых волос и волос-образцов резко не соответствуют, то количество вводимого в опыт материала можно дозировать по весу на аналитических весах.

Технические особенности определения групповых факторов в волосах методом РАЭ. Прежде всего, необходимо отметить, что для исследования в РАЭ волосы, которые на этапе морфологического исследования подвергали воздействию ксилола, для определения групповой принадлежности являются непригодными, так как ксилол губительно действует на АГ волос, которые изначально являются более слабыми чем АГ крови.

Перед введением волос в реакцию их необходимо тщательно протереть мыльным ватным тампоном, а затем, промыть в проточной воде. Контакт волос с моющими средствами и их промывка должны занимать не более одной минуты, чтобы избежать адсорбции моющих средств. Поскольку АГ легче адсорбируются волосами, насыщенными водой, их следует до следующего рабочего дня выдержать в дистиллированной воде. При специфическом загрязнении волос их продолжают отмывать в регулярно меняемой дистиллированной воде до 2-3 суток. Избыток воды с волос промокают фильтровальной бумагой. Чистые, подсушенные волосы необходимо раздавить, чтобы облегчить доступ АТ к АГ, содержащимся в стержне волоса. Для этого волос укладывают на предметное стекло и прокатывают по нему стеклянной цилиндрической пробиркой с легким нажимом, при этом раздавленный волос будет выглядеть более широким и плоским. Для каждой новой группы волос необходимо менять стекла и пробирки, чтобы избежать загрязнения чужеродным АГ. Рабочей поверхности посуды руками касаться нельзя и, в целом, все манипуляции с волосами следует проводить в перчатках, чтобы избежать наложения на волосы выделений пота, содержащих собственные групповые факторы.

Раздавленные волосы делят на несколько частей, соблюдая эквивалентные соотношения по толщине, количеству и длине фрагментов волос-улик с фрагментами заведомых образцов волос из коллекции отделения и волос-образцов, предоставленных для сравнения. Для абсорбции заливают по 4-6 фрагментов волоса длиной по 0,5-1,0 см из различных участков стержня. Для выявления антигенов А, В и Н используют диагностические сыворотки, взятые в титре 1:128, соблюдая соотношение 1 капля реагента на 2 фрагмента волос. Длительность абсорбции 20-24 часа. Поскольку изосыворотки содержат

и антитела класса IgM, требующие пониженной температуры, и антитела класса IgG, работающие в комнатных условиях, то оптимальный температурный режим для абсорбции создается при сочетании комнатной температуры с последующим помещением на пониженную температуру (+4°C). Количество отмываний от неабсорбированных АГ лучше всего подбирать на образцах волос, доставленных для сравнительного исследования, если таковые отсутствуют, то на заведомых образцах волос всех групп, включая образцы волос человека группы АВ невыделителя. Как правило, режим отмывания состоит из 2-3 повторов длительностью 30-60 секунд. Для отмывания лучше использовать охлажденный физиологический раствор, так как в случае излишнего пропитывания волоса водой, повышается риск гемолиза эритроцитов на этапе элюции. Элюцию АГ можно проводить на предметных стеклах, поместив их во влажную камеру, или в пробирках. Применяют 0,1-0,05% взвесь тест-эритроцитов, приготовленную на 1-3% альбумине или на 1,5% сыворотке человека группы АВ. Оптимальная температура для этого этапа – $50 \pm 2^\circ\text{C}$, длительность – 20-30 минут. После выдержки в термостате предметные стекла оставляют во влажных камерах при комнатной температуре. Микроскопический учет результатов можно начинать спустя 30 минут, накрыв элюат покровными стеклами. Этап учета реакции (под контролем специфичности и с регулярной микроскопией) может быть продлен до нескольких часов. В случае проведения элюирования в пробирки их после термостата резко охлаждают и центрифугируют 2-4 минуты при 1-1,5 тыс. об./минуту. с последующим микроскопическим учетом результата.

На этапе оценки результатов исследования, если все введенные контрольные образцы продемонстрировали высокую и активность, и специфичность, то вывод о групповой принадлежности волос может быть произведен по выявленным АГ. Если в какой-то части результаты реакции являются сомнительными или невозпроизводимыми, то высказываются только о гарантированно выявленных факторах. Если волосы контактировали с кровью, потом, слюной (иными выделениями), то избежать выявления антигенов этих биологических жидкостей в РАЭ практически невозможно. Иными словами, при определении групповой принадлежности волос будут определяться как АГ волос, так и крови (выделений). Аналогичная ситуация возникает и в случае воздействия на волосы микроорганизмов (плесень, гниение).

Избежать ложно-положительного результата реакции, вызванного загрязнениями (как специфическими, так и неспецифическими) можно применив особо тщательное отмывание на этапе подготовки волос к исследованию в РАЭ.

9.6. Установление групповой принадлежности волос реакцией смешанной агглютинации

РСА – сложная иммунологическая реакция антиген-антитело, которая состоит из двух простых реакций: абсорбции, когда АГ клетки связывает часть валентностей АТ диагностического реагента и реакции агглютинации своеобразной формы, когда АТ, соединенные с АГ исследуемого объекта, в то же время присоединяют (агглютинируют) стандартные тест-эритроциты. Эти две реакции идут последовательно, но наблюдаются одновременно.

В РСА участвуют три иммунологических компонента:

- 1) АГ исследуемого объекта (клетки или пятна);
- 2) АТ диагностической сыворотки, связанные одновременно с антигенами двух разных объектов;
- 3) АГ тест-эритроцитов. В РСА антитела находятся в связи как с объектом, так и с тест-эритроцитами, элюция АТ в РСА недопустима.

РСА, как и РАЭ, основана на том, что молекула АТ имеет по крайней мере две валентности или два активных центра, способных соединиться с соответствующими антигенными детерминантами. РСА не сопровождается искусственной диссоциацией комплексов антиген – антитело, а заключается в использовании свободных активных центров абсорбированных антигеном антител для агглютинации тест-эритроцитов той же групповой специфичности. Принципиальным различием в подходе к проведению РАЭ и РСА является то, что для успешного проведения РАЭ необходимо максимально усиливать искусственную диссоциацию комплексов антиген – антитело, а для проведения РСА – максимально ограничить спонтанную диссоциацию этих комплексов.

Для реакции используют альфа и бета изосыворотки и МКАТ анти-Н- с титром 1:64 и выше. Предварительное фиксирование материала метанолом, проведение абсорбции и удаление несвязавшихся АТ в РСА осуществляются в той же последовательности, что и при РАЭ. К отмывым объектам добавляют взвесь эритроцитов-индикаторов, причем для эритроцитов А и В готовят 0,5% взвесь, а для эритроцитов 1,5% взвесь (на 1,5% растворе сыворотки группы АВ,

предварительно проверенной на отсутствие экстраагглютининов). Можно использовать в РСА так называемую индикаторную взвесь, представляющую собой отмытые агглютинаты эритроцитов, сенсibilизированных антиглобулиновой сывороткой. Применение такой взвеси позволяет получать стабильные результаты при слабой выраженности АГ в исследуемом пятне, а также в тех случаях, когда наступает полная блокада группоспецифических валентностей антител антигенами пятна крови.

После добавления соответствующих тест-эритроцитов или индикаторной взвеси препараты инкубируют во влажных камерах в течение 1-1,5 часов при температуре 6°C. Учет результатов РСА проводят микроскопически на предметных стеклах, сначала не накрывая их покровными стеклами, а затем – и под ними. Появление на исследуемых объектах эритроцитарных бус и свободнолежащих вокруг объектов агглютинатов, в сочетании с отсутствием их в контрольных участках свидетельствует о наличии того или иного АГ. Свободно плавающие агглютинаты эритроцитов в расчет не принимают. При сомнительных результатах увеличивают время абсорбции АГ или же осуществляют повторную постановку реакции.

9.7. Установление половой принадлежности волос (исследование проводится экспертами-цитологами).

Корневой участок волоса помещают в пробирку с 10-25% раствором уксусной кислоты и экстрагируют в течение 18-24 часов при комнатной температуре. Набухшее наружное корневое влагалище под стереомикроскопом измельчают препаративными иглами, отделяя его от внутреннего корневого влагалища остатки стержня и луковицы, которые удаляют из препарата. Затем препараты высушивают, фиксируют и окрашивают производными акрихина. Готовые препараты исследуют при помощи люминесцентного микроскопа на Y-хроматин. После чего препараты окрашивают 0,1% раствором азур-эозиновой смеси и исследуют при помощи светового микроскопа на X-хроматин. Таким образом, при микроскопии в ядрах клеток наружного корневого влагалища волоса выявляют либо Y-хроматин либо X-хроматин, которые указывают на его половую принадлежность.

10. ЭКСПЕРТИЗА ПРОЧИХ ОБЪЕКТОВ

При исследовании кусочков органов, тканей и гистологических препаратов вначале решают вопрос об их принадлежности определенному органу или ткани, если кусочки изъяты на месте происшествия. Данное исследование производят с помощью эксперта, производившего осмотр трупа на месте происшествия. Если же материал уже определен и передан на дополнительное исследование в отделение судебно-гистологической экспертизы СЭО, то подобную работу не производят.

Группоспецифические антигены системы АВ0 выявляют РАЭ и РСА, которые используют параллельно, стараясь охватить как можно больший объем материала. Это связано с неодинаковой выраженностью АГ в подобных объектах.

Для установления групповой принадлежности частей расчлененного трупа или при исследовании эксгумированного трупа анализируют ногти, кости, зубы, волосы. При работе с костными фрагментами, ногтевыми пластинками, зубами рекомендуется пользоваться различными модификациями РАЭ и в дальнейшем сопоставлять все полученные результаты.

Наличие кала определяют по цитологической картине приготовленных мазков (группу изолированного кала не устанавливают).

Наличие бывшей беременности устанавливают по морфологической картине секрета молочных желез судебно-цитологическими методами.

При работе с гнилыми мышцами возможно выявление группоспецифических антигенов системы АВ0, но предварительно необходимо провести специальную работу по подготовке материала для исследования (длительное промывание водой, отмывание в хлороформе, и др.)

11. СУДЕБНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ, ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Судебно-медицинская цитология – это раздел судебной медицины, изучающий следы биологического происхождения на клеточном уровне.

Судебно-цитологическая экспертиза – это подвид судебно-медицинской экспертизы, которая решает задачи установления клеточной природы изучаемых объектов и возможности их происхождения от конкретных лиц с помощью определенных алгоритмов, сочетающих в себе морфологические, цитохимические, иммунологические методы исследования.

Судебно-цитологические экспертизы и исследования проводят врачи – судебно-медицинские эксперты отделений судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы, имеющие специальную подготовку по судебно-медицинской цитологии (эксперты-цитологи).

Врач – судебно-медицинский эксперт отделения судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы, имеющий соответствующую подготовку по судебно-медицинской цитологии, в рамках судебно-биологической экспертизы, при постановке органом или лицом, назначившим проведение экспертизы, единого блока вопросов, выполняет весь комплекс исследований, состоящий из биологической и цитологической частей экспертной работы.

Для установления возможности происхождения изолированных клеток на представленных вещественных доказательствах (предметах и объектах) от конкретных лиц, проходящих по делу, применяются цитологические методы исследования (групповая принадлежность клеток, определяемая методом РСА и половая принадлежность).

Объектами судебно-цитологического экспертного исследования являются изолированные клетки и микрочастицы органов и тканей, выявляемые среди других следов биологического происхождения на орудиях механической травмы и других вещественных доказательствах, в подногтевом содержимом рук и на одежде потерпевших и подозреваемых в совершении различных преступлений, а также на половых органах и одежде лиц, совершивших преступления против половой неприкосновенности.

Описание морфологических характеристик клеток органов и тканей изложено в соответствующих монографиях, руководствах и учебных пособиях.

Особенностями судебно-цитологических экспертных исследований является этап поиска, как правило, весьма немногочисленных («изолированных»), зачастую единичных и деформированных клеток, подвергшихся различным неблагоприятным воздействиям факторов внешней среды и отличающихся значительным полиморфизмом.

Основными поводами для назначения судебно-цитологического экспертного исследования являются:

- выявление клеток органов и тканей человека на орудиях травмы;
- выявление клеток вагинального, ректального эпителия и буккального эпителия при половых преступлениях;
- установление половой принадлежности крови, волос, слюны, частиц органов и тканей на вещественных доказательствах [58].

Вопросы, разрешаемые в результате проведения судебно-цитологического экспертного исследования:

- о наличии в следах клеток и микрочастиц тканей животного происхождения;
- об органно-тканевом происхождении клеток и микрочастиц;
- о видовой принадлежности; о групповой и половой принадлежности;
- о возможности происхождения клеток и микрочастиц от конкретных лиц, проходящих по делу [84].

Также при судебно-цитологическом экспертном исследовании могут быть разрешены вопросы о наличии на вещественных доказательствах содержимого желудочно-кишечного тракта (рвотных масс, кала, мекония), о менструальном происхождении крови и бывших родах (по отделяемому молочным железам).

Вопросы, разрешаемые в результате проведения судебно-цитологического экспертного исследования по делам о половых преступлениях:

- о наличии клеток влагалищного, буккального, прямокишечного эпителия в мазках-отпечатках и смывах с половых органов подозреваемых, в

подногтевом содержимом и следах на одежде, свидетельствующих о виде полового контакта;

- о групповой и половой принадлежности эпителиальных клеток;
- о возможности происхождения клеток от конкретного лица [84].

Методы, применяемые в судебно-медицинской цитологии:

- световая микроскопия: поиск и обнаружение клеток, оценка их морфологических характеристик, диагностика регионального и органно-тканевого происхождения;
- люминесцентная микроскопия; установление видовой и половой принадлежности изолированных клеток, частиц органов и тканей;
- иммунологический: реакция смешанной агглютинации - установление антигенной характеристики изолированных клеток;
- спектрофотометрический: обнаружение следов мекония;
- ферментный: обнаружение следов рвотных масс, содержимого желудочно-кишечного тракта.

Проведение судебно-цитологической экспертизы включает в себя три основных этапа, как и в судебно-медицинской биологии:

1. Предварительный этап.
2. Основной этап (лабораторных исследований).
3. Заключительный этап (оформления результатов экспертных исследований).

11.1. Порядок взятия материала для судебно-цитологической экспертизы и исследования

При назначении судебно-цитологической экспертизы по делам о половых преступлениях перед экспертами ставятся вопросы, для разрешения которых требуется исследование содержимого влагалища, полости рта, прямой кишки потерпевших, смывов и отпечатков с половых членов подозреваемых.

Изъятие образцов необходимо производить с соблюдением следующих правил:

– содержимое влагалища у женщин целесообразно брать сразу после совершения преступления – сохранность сперматозоидов в половых путях живых женщин составляет 5-7 дней (при условии, если потерпевшая не предпринимала никаких гигиенических манипуляций), но количество их резко уменьшается уже в течение первых суток. Содержимое влагалища берется на чистый марлевый тампон, при этом обрабатываются своды, наружный зев и шейка матки. Отработанным тампоном на чистые предметные стекла наносятся поверхностные мазки, подсушиваются, упаковываются и подробно надписываются;

– содержимое полости рта у потерпевших желательно изымать в течение нескольких часов с момента совершения преступления. Аналогично марлевым тампоном протирается слизистая оболочка губ, щек, десен, зубов, лакуны, миндалины, после чего содержимое тампона переносится на предметное стекло и высушивается;

– содержимое прямой кишки у потерпевших следует брать до акта дефекации. Предварительно производится смыв вокруг анального отверстия (тампон исследуется самостоятельно) после этого новым тампоном берут содержимое прямой кишки, вводя тампон на глубину 3-6 см. Все тампоны с образцами перед упаковкой высушиваются.

При взятии мазков-отпечатков с полового члена следует учитывать, что проведение подозреваемым гигиенических мероприятий, способно полностью исключить возможность обнаружения чужеродного биологического материала. Как правило, безрезультатно изъятие мазков-отпечатков позднее, чем через 3 дня после совершения преступления. При взятии отпечатков чистые, слегка смоченные водой предметные стекла одной из сторон плотно прикладываются к наружной поверхности полового члена, внутренней поверхности крайней плоти венечной борозды, к головке полового члена. Отпечатки просушивают, стекла складывают отпечатками внутрь, проложив между ними спички, и связывают, предварительно промаркировав каждое стекло. Стекла укладывают в коробки и направляют на исследование. При взятии смывов, что менее желательно, марлевыми тампонами, слегка смоченными водой, протирают названные выше участки, тампоны подсушивают, упаковывают и направляют на исследование.

Перечисленные объекты отбираются: у трупов – врачами – судебно-медицинскими экспертами отделений судебно-медицинской экспертизы

трупов; у живых лиц – либо врачами – судебно-медицинскими экспертами отделений судебно-медицинской экспертизы живых лиц, либо с привлечением врачей клинических специальностей (урологами, сексопатологами, гинекологами, андрологами).

Важные вещественные доказательства можно получить, исследовав подногтевое содержимое потерпевшего и подозреваемого. Для этого ногтевые пластинки указанных лиц срезают очень острыми чистыми ножницами, стараясь не повредить мягких тканей и полностью захватить выступающий край ногтевой пластины.

Подногтевое содержимое, равно как и следы чужеродных биологических выделений в естественных отверстиях трупов, подлежат обязательному исследованию вне зависимости от времени с момента совершения преступления, за исключением случаев, когда исследование невозможно из-за далеко зашедших гнилостных изменений трупа.

Предметы (вещественные доказательства), представленные для проведения судебно-цитологической экспертизы (исследования), просматривают визуально при естественном и смешанном освещении, отмечая участки со следами, подозрительными на кровь, выделения (в которых могут содержаться клетки) и другие следы биологического происхождения. При необходимости, особенно при исследовании орудий травмы, производят стереомикроскопию (увеличение $\times 32$). Для обнаружения следов (крови на темных тканях и выделений на светлых тканях) предлагается просмотр вещественных доказательств в ультрафиолетовых лучах с помощью УФЛ-ламп в затемненном помещении. В зависимости от вида следа или микрочастиц, а также в зависимости от их расположения на предметах или тканях, на предварительном этапе цитологического экспертного исследования существуют несколько вариантов (способов) изъятия биологического материала и изготовления цитологических препаратов

Если обнаруженные следы расположены на предметах одежды, состоящих из нескольких слоев текстильной ткани, бумаги и т.д. предпочтительно использовать для приготовления цитологических препаратов поверхностный слой и, при возможности, из разных участков пятна. При расположении следов крови и выделений на твердых поверхностях (металл, стекло и др.) производят либо соскобы с помощью скальпеля, либо смывы нитями стерильной марли, увлажненными уксусной кислотой (чаще

10% раствором) или дистиллированной водой, либо смывы-соскобы путем нанесения капли уксусной кислоты той же концентрации на исследуемое пятно и последующего соскабливания концом пастеровской пипетки или скальпелем. В том случае, если исследуемый объект находится на деревянной не обработанной поверхности, то лучше вырезать часть дерева с пятном, а не производить соскоб пятна или смыв.

11.2. Общий алгоритм судебно-цитологической экспертизы и исследования

Дальнейшее проведение судебно-цитологического экспертного исследования осуществляется по определенному алгоритму.

Вырезку из пятна (соскоб, смыв), помещают в центрифужную пробирку и заливают раствором уксусной кислоты в таком количестве, чтобы она полностью покрывала исследуемый объект. Растворы уксусной кислоты различной концентрации от 10% до 25% обладают оптимальными свойствами для извлечения клеточных элементов со следов на вещественных доказательствах. Концентрация раствора уксусной кислоты, используемого для извлечения клеток, зависит от предмета исследования и давности образования следов. Так для следов выделений и «свежих» (до 2-х месяцев с момента образования) следов крови предлагается применять 10% раствор уксусной кислоты, при более «старых» пятнах (свыше 2-х месяцев) – 15% раствор, для приготовления препарата при установлении половой принадлежности волос и микрочастиц ткани – 25% раствор. Извлечение клеток производят при комнатной температуре. Время экстрагирования выбирается экспертом в зависимости от характера объекта исследования – свежие пятна крови и выделений – 1 сутки, старые – 2-3 суток, волосы (микрокусочки ткани) – 30-40 минут, до микроскопически заметного набухания. После заливки исследуемого объекта уксусной кислотой, пробирку закупоривают ватной пробкой и оставляют при комнатной температуре. Время экстрагирования зависит от «возраста» пятна. После экстрагирования, экстракты ресуспензируют, кусочки предмета-носителя извлекают и отжимают, содержимое пробирок центрифугируют при 1500 об./минуту в течение 5 минут. Надосадочную жидкость удаляют пастеровской пипеткой, оставляя над осадком небольшой слой жидкости. Если жидкость, извлекаемая из пятна крови, окрашена, то в пробирку наливают новую порцию раствора уксусной

кислоты, осадок взбалтывают и вновь центрифугируют. Этот прием повторяют до тех пор, пока слой жидкости над осадком не станет бесцветным. При приготовлении цитологических препаратов из следов выделений осадок, ресуспендируя в новых порциях уксусной кислоты, промывают 2-3 раза для удаления белка, который может препятствовать дальнейшему исследованию препарата. После последнего центрифугирования содержимое пробирки и надосадочную жидкость удаляют, оставляя небольшое количество ее, которое перемешиваем с осадком тонкой пастеровской пипеткой и наносим на предметное стекло в виде капли диаметром не более 1 см. Обычно из каждого объекта исследования изготавливают 2-3 цитологических препарата. В случае значительного осадка, его разводят в большем количестве надосадочной жидкости и готовят большее число препаратов, что уменьшает степень их загрязненности. Препараты высушивают при комнатной температуре вдали от источников тепла и прямого солнечного излучения.

Маркировка препарата производится специальным маркером (карандашом) с указанием номера экспертизы, объекта, препарата. После высушивания мазков на предметных стеклах производится их фиксация, служащая для закрепления и сохранения структуры клетки. Основным требованием к фиксирующим жидкостям является способность быстро проникать в клетки и не вызывать глубоких нарушений их структуры. К фиксирующей жидкости, используемой в судебно-медицинской цитологии, относится этиловый спирт. После фиксации мазков выполняется их флюорохромирование красителями акрихинового ряда, осуществляется поиск и обнаружение клеток с сохраненной тканевой структурой, определяется их половая принадлежность по X- и Y-хроматину. Затем производится выявление антигенов системы АВ0 с помощью РСА.

11.3. Характеристика и свойства цитологических красителей, приготовление рабочих растворов

При проведении судебно-цитологических экспертных исследований применяются различные типы цитологических красителей, обладающие определенными физико-химическими свойствами и предназначенными для решения конкретных задач (таблица 1).

Типы, наименование и предназначение красителей, используемых при проведении судебно-цитологических экспертных исследований

Типы красителей	Наименование красителей (растворы)	Цель применения
Основные	Азур II Толуидиновый голубой Метиленовый синий	Диагностика половой принадлежности клеток по X-хроматину, определение пола крови по полоспецифическим отросткам гранулоцитов
Нейтральные	Смесь двух красителей: основного (азур II) и кислого (эозин)	Установление наличия клеток, диагностика органно-тканевого происхождения, определение половой принадлежности по X-хроматину и по полоспецифическим отросткам гранулоцитов
Азиновые	Амидочерный 10 Б Нигрозин	Дифференцирование клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия гистохимическим методом по морфологии клеток и по наличию белковых включений в цитоплазме
Препараты йода	Йод Люголь	Выявление гликогена в клетках, зерен крахмала, йодофильной микрофлоры
Флюорохромы	Акрихин Атебрин Мепакрин Квинакрин	Установление наличия клеток и диагностика половой принадлежности клеток по X- и Y-хроматину, определение пола крови по Y-хроматину и по полоспецифическим отросткам гранулоцитов
	Акридиновый оранжевый	Установление наличия клеток, установление органно-тканевого происхождения клеток по их цитохимическим особенностям, определение половой принадлежности по X-хроматину и крови по полоспецифическим отросткам гранулоцитов
	Родамин 6 Ж	Выявление гликогена в клетках методом люминесцентной микроскопии

Приготовление специальных красителей для окраски цитологических препаратов осуществляют следующим образом: вначале готовят маточные растворы на дистиллированной воде, а затем их разводят до рабочей

концентрации (таблица 2). Продолжительность окраски цитологических препаратов определяется свойствами самого красителя.

Таблица 2

Приготовление растворов красителей и продолжительность окраски цитологических препаратов

Наименование красителя	Концентрация маточного раствора (на дист. воде)	Приготовление рабочего раствора	Продолжительность окраски
Акрихин	0,1% раствор	Маточный раствор разводят до концентрации 0,001-0,0005% дист. водой	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 10-15 сек.
Акридиновый оранжевый	0,1% раствор	Маточный раствор разводят забуференным фосфатным буфером дист. водой (рН 5,5-6,0) до концентрации 0,01%	Мазки окрашивают в течение 2 мин., промывают водой 10-15 сек.
Родамин Ж	0,1% раствор	0,01% рабочий раствор готовят на 0,05 М растворе натрия тетраборнокислого с рН 9,0	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 10-15 сек.
Азур-эозиновая смесь	0,1% р-р азура II, 0,1% р-р эозина	1 часть раствора эозина, 3,5 части дист. воды с рН 7,0 и 1,5 части раствора азура II. Красители смешивают, осторожно покачивая посуду	Мазки окрашивают в течение 20-30 мин., промывают водой 10-15 сек.
Нигрозин	1% раствор	0,05% рабочий р-р готовят на 10% р-ре уксусной к-ты	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 1-2 мин.
Амидочерный 10 Б	1% раствор	0,05% рабочий р-р (1 мл маточного раствора и 19 мл смеси Карнуа)	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 1-2 мин.
Толуидиновый голубой	—	1% р-р на 40% р-ре уксусной кислоты	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 20-30 сек.
Метиленовый синий	—	1% р-р на 40% р-ре уксусной кислоты	Мазки окрашивают в течение 10 мин., промывают водой 20-30 сек.
Люголь	—	1 г кристаллического йода и 2 г йодистого калия растворяют в 10-	На препарат наносят каплю р-ра Люголя, накрывают

		20 мл дист. воды и доводят объем до 300 мл дист. воды	покровным стеклом и микроскопируют
--	--	---	------------------------------------

11.4. Техника окраски цитологических препаратов

Окраска для обнаружения Y-хроматина. Y-хроматин в ядрах клеток позволяют выявить только флюорохромы акрихинового ряда (акрихином и его аналогами): атебрином, мепакрином, пропилакрихинипритом, квинакриндихлоридом.

Окраска акрихином. Мазки фиксируют, погружая предметные стекла в специальную камеру с этиловым спиртом на 10 минут. На фиксированные мазки с помощью пипетки наносят раствор 0,001-0,0005% акрихина с избытком, окраска в течение 10 минут. Промывание окрашенных мазков проточной водой 10-15 секунд. Высушивание. Люминесцентная микроскопия.

Окраска акридиновым оранжевым. Акридиновый оранжевый – метахроматический люминесцентный краситель (хлоргидрат 3,6 бидиметиламиноакридина), обладающий способностью дифференцированно окрашивать ДНК и РНК структуры клетки. Дифференцированное окрашивание ДНК- и РНК-структур определяется концентрацией красителя и рН среды. Особенностью акридинового оранжевого является способность существовать в моно- и димерной форме. Мономерная форма существует в сильно разбавленных растворах меньше 0,01% имеет максимум люминесценции 530 нм (зеленая область спектра) и образует комплекс с 2-х спиральными нуклеиновыми кислотами – ДНК, 2-х спиральная РНК вирусов, 2-х спиральные участки клеточных РНК и белками. Димерная форма существует в концентрированных растворах 0,1-0,05%, имеет максимум люминесценции 640 нм (красная часть спектра) и образует комплексы с односпиральными нуклеиновыми кислотами (РНК, односпиральная ДНК вирусов и бактериофагов, деполимеризованная ДНК) и мукополисахаридами. Двухцветное окрашивание РНК– и ДНК-содержащих структур наблюдается при значениях рН=3,0-6,0, причем, чем ближе значение рН к 6,0, тем меньшее количество РНК может быть выявлено. При окраске цитологических препаратов акридиновым оранжевым необходимо строго соблюдать методику окрашивания: мазки фиксируют, погружая предметные стекла в специальную камеру с этиловым спиртом на 10 минут; на фиксированные мазки с помощью

пипетки наносят раствор 0,01% акридинового оранжевого, приготовленный на фосфатном буфере рН=6,0 в течение 2-х минут; промывание окрашенных мазков проточной водой 30 секунд; дифференцирование 5% раствором хлорида кальция (CaCl) 30 секунд – 1 минуту; промывание в проточной воде 1 минуту; микроскопия в падающих ультрафиолетовых лучах с помощью люминесцентного микроскопа. Приготовление фосфатного буфера: в 1 л дистиллированной воды растворяют 1,78 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (раствор А); в 1 л дистиллированной воды растворяют 1,36 г калия фосфорнокислого однозамещенного (раствор Б). Для получения буферного раствора с рН=6,0 смешивают 12 мл раствора А с 88 мл раствора Б, с рН= 8,0-9,0 – 90 мл раствора А с 10 мл раствора В. Приготовление забуференной дистиллированной воды: 900 мл дистиллированной воды смешивают с 75 мл раствора А и 25 мл раствора В.

Окраска азур-эозиновой смесью. Мазки фиксируют, погружая предметные стекла в специальную камеру с этиловым спиртом на 10 минут. На фиксированные мазки с помощью пипетки наносят 0,1% раствор азура II и водорастворимого эозина на дистиллированной воде, окраска в течение 20-30 минут. Промывают окрашенные мазки проточной водой 10-15 секунд. Высушивание. Световая микроскопия.

Окраска красителем амидочерным 10 Б. Фиксация смесью Карнуа 10 минут, промывание окрашенных мазков проточной водой 10-15 секунд, высушивание; окраска 10 минут 0,1% раствором амидочерного 10 Б, приготовленным на 10% растворе уксусной кислоты; промывание окрашенных мазков проточной водой 20-30 секунд. Высушивание. Световая микроскопия.

Окраска водорастворимым нигрозином. Фиксация смесью Карнуа 10 минут, промывание окрашенных мазков проточной водой 10-15 секунд, окраска 10 минут 0,05% раствором нигрозина, приготовленным на 10% растворе уксусной кислоты, промывание окрашенных мазков проточной водой 20-30 секунд. Высушивание. Световая микроскопия.

Для приготовления 100 мл смеси смеси Карнуа смешивают 10 мл ледяной уксусной кислоты, 30 мл хлороформа и 60 мл 96° этанола. К 1 части маточного раствора добавляют 12 частей смеси Карнуа. Амидочерный 10 Б и нигрозин хорошо растворимы в воде, использование объектива водной иммерсии запрещается.

Окраска метиленовым синим (толуидиновым голубым). Мазки фиксируют, погружая предметные стекла в специальную камеру с этиловым спиртом на 10 минут. На фиксированные мазки с помощью пипетки наносят 1% водный раствор основного красителя (метиленового синего или толуидинового голубого), приготовленного на 40% растворе уксусной кислоты, окраска 5-10 минут. Промывание окрашенных препаратов проточной водой 20-30 секунд. Высушивание; Световая микроскопия.

Окраска раствором Люголя. Высушенные мазки на предметных стеклах помещают на 20 минут в чашки Петри, на дно которых налит раствор Люголя. При другом варианте окраски непосредственно на препарат с помощью пипетки наносят каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

11.5. Установление половой принадлежности крови и клеток

Установление половой принадлежности клеток (генетического пола) основано на выявлении в их ядрах половых меток, морфологическим субстратом которых являются половые X- и Y-хромосомы. Для диагностики половой принадлежности клеток пригодны не все ядра, а только находящиеся в интерфазе (т.е. в стадии покоя между делениями). В связи с этим необходимо проводить отбор ядер, пригодных для исследования. Все ядра, не удовлетворяющие этим критериям (поврежденные, сморщенные, с крупноглыбчатой хроматиновой структурой, интенсивно окрашенные), являются непригодными для диагностики половой принадлежности.

Диагностика половой принадлежности клеток возможна двумя способами:

1. По процентному содержанию ядер с половой меткой;
2. С помощью метода последовательного анализа Вальда.

Применение метода последовательного анализа Вальда целесообразно при выявлении в препаратах небольшого числа ядер, пригодных для исследования, что часто встречается в практике. В основе метода лежит рассчитанная с заданной величиной ошибки вероятность принадлежности клеток к мужскому или женскому генетическому полу в зависимости от числа исследованных ядер и содержания в них половой метки. Положительным качеством последовательного анализа Вальда является возможность оценки результатов исследования не в конце его проведения, как это принято при

использовании других математических методов, а в процессе изучения материала. Поэтому отпадает необходимость в просмотре всех ядер, содержащихся в препарате, поскольку уже на определенном этапе исследования можно сделать вывод о половой принадлежности.

11.5.1. Диагностика половой принадлежности клеток по X-хроматину

Морфологическим субстратом X-хроматина (телец Барра) является сильно спирализованная, гиперпикнотическая X-хромосома. В ядрах клеток, происходящих от женщин, X-хроматин имеет вид интенсивно и гомогенно окрашенной глыбки, размерами в среднем $0,7 \times 1,2$ мкм, преимущественно полукруглой или треугольной формы, прилежащей к внутренней поверхности ядерной мембраны. Хроматиновые глыбки с иной локализацией в ядре не учитываются, т.к. их невозможно отдифференцировать от других аутомомных телец, не обладающих половой специфичностью. Для отличия X-хроматина от других хроматиновых телец следует учитывать такой морфологический признак, как наличие вокруг глыбки светлой (при окраске основными красителями) или темной (при люминесцентной микроскопии) зоны, называемой «нимбом». Встречаемость «нимба» отмечается в 80-90% случаев. X-хроматин выявляется у всех женщин с нормальным хромосомным набором (46XX) с частотой 20-80%.

У мужчин (примерно в 8%) могут встречаться хроматиновые глыбки, имитирующие X-хроматин по форме и локализации. Они обычно бывают треугольной или палочковидной формы, «нимб» вокруг них отсутствует, а размеры не превышают 0,8 мкм. Истинный X-хроматин у мужчин может встречаться только в 2-х случаях: при синдроме Клайнфельтера (кариотип 47XXY) и в ткани эмбриональной опухоли тератомы яичка. X-хроматин не обладает видовой специфичностью, т.к. содержится в ядрах клеток самок многих млекопитающих. В ядрах лейкоцитов X-хроматин не определяется. Для выявления X-хроматина в ядрах могут быть использованы окраски азур-эозиновыми смесями, основными красителями и флюорохромами.

Диагностика половой принадлежности клеток по X-хроматину возможна по процентному содержанию ядер с половой меткой (женский пол – не менее 20% ядер с X-хроматином, мужской пол – не более 8% ядер, содержащих X-хроматиноподобных образований) и с помощью метода последовательного анализа Вальда (таблица 3).

Соотношение X-хроматинположительных и X-хроматинотрицательных ядер для диагностики половой принадлежности клеток (по Антоновой С.Н., Любинской С.И., 1980)

Число ядер			
С X-хроматином (не менее)	Подлежащих исследованию	С X-хроматиноподобными образованиями (не более)	Подлежащих исследованию
Женский пол		Мужской пол	
3	4	0	25
4	14	1	35
5	24	2	45
6	34	3	55
7	44	4	65
8	54	5	75
и так далее			

11.5.2. Диагностика половой принадлежности клеток и крови по Y-хроматину

Y-хроматин в клеточных ядрах и ядрах лейкоцитов крови выявляется при флюорохромировании препаратов растворами акрихина и его производными (атебрин, мепакрин, квиакрин, пропил-акрихин-иприт). Он имеет вид ярко светящейся глыбки величиной 0,2-0,8 мкм, которая может находиться в любой части ядра. В 6-12% клеточных ядер Y-хроматин может быть представлен двумя близко расположенными тельцами, светящимися менее интенсивно по сравнению с одиночными образованиями. Морфологическим субстратом Y-хроматина является яркая и постоянная флюоресценция длинных плеч Y-хромосомы, не свойственная аутосомам и X-хроматину.

Кроме Y-хроматина, в ядрах могут выявляться мелкие светящиеся тельца, обозначаемые как Ф-хроматин (или Ф-тельца), являющиеся участками аутосом и встречающиеся в ядрах независимо от пола. Величина их колеблется в пределах 0,1-0,2 мкм, интенсивность свечения ниже, чем Y-хроматина. В ядрах клеток органов и тканей, влагалищных оболочках волос и буккального эпителия мужчин встречаемость Y-хроматина составляет 25-95%, в лейкоцитах крови – 22-98%. В женских клетках Ф-тельца выявляются в 0-9%, в крови – в 0-5% ядер. Локализация Y-хроматина в ядрах частично

зависит от типа ткани и формы ядра. Так, в лимфоцитах он обычно располагается на периферии ядра и имеет вид узкого серпа; в ядрах гранулоцитов часто локализуется в отростках. В ядрах веретенообразной формы Y-хроматин обычно находится у одного из полюсов его, в ядрах с ядрышками преимущественно располагается около них. Y-хроматин, выявляемый в клеточных ядрах, специфичен только для человека и самцов горилл (которые обитают исключительно в экваториальной Африке и являются очень редким видом). Поэтому наличие Y-хроматина в ядрах свидетельствует не только о мужском генетическом поле клеток и крови, но и о происхождении их от человека, т.е. о видовой принадлежности.

В настоящее время единственным способом выявления Y-хроматина является метод люминесцентной микроскопии клеток и крови, флюорохромированных акрихином или его производными.

Диагностика половой принадлежности клеток и крови возможна в двух вариантах – по процентному содержанию ядер с Y-хроматином (мужской пол – не менее 22% ядер с Y-хроматином, женский пол – не более 7% ядер, содержащих Ф-тельца) и с помощью последовательного анализа Вальда (таблица 4).

Таблица 4

Соотношение Y-хроматинположительных и Y-хроматинотрицательных ядер для диагностики половой принадлежности крови и клеток (по Антоновой С.Н., Любинской С.И., 1980)

Число ядер			
С Y-хроматином (не менее)	Подлежащих исследованию	С Y-хроматиноподобными образованиями (не более)	Подлежащих исследованию
Мужской пол		Женский пол	
3	9	0	22
4	19	1	32
5	29	2	42
6	39	3	52
7	49	4	62
8	60	5	72
и так далее			

11.5.3. Диагностика полового происхождения крови по полоспецифическим отросткам

В ядрах гранулоцитов крови встречается 4 вида отростков: типа А, типа В, типа С, типа D. Из них половой специфичностью обладают только отростки

типа А и В, характерные для лиц женского генетического пола. Отростки типа С и D встречаются примерно с одинаковой частотой у мужчин и женщин (таблица 5).

Таблица 5

Соотношение числа ядер гранулоцитов с полоспецифическими отростками и без них для диагностики половой принадлежности крови в следах (по Федоровцеву А.Л. и соавт., 2009)

Число ядер			
С отростками типа А или В (не менее)	Подлежащих исследованию	С имитирующими отростки типа А или В (не более)	Подлежащих исследованию
Женский пол		Мужской пол	
4	20	0	120
5	55	1	155
6	90	2	190
7	125	3	225
8	160	4	260
9	195	5	295

В гранулоцитах мужской крови иногда выявляются образования, напоминающие отростки типа А, но, величина их не превышает 1-1,2 мкм, головка имеет не округлую или каплевидную, а уплощенную форму, на ножке часто бывают булавовидные утолщения. Отростки, подобные отросткам типа В, иногда обнаруживаются в ядрах гранулоцитов мужской крови, но в значительно меньшем количестве, чем у женщин.

Содержание ядер с отростками типа А в женской крови составляет в среднем 2,28-3,22%, типа В – 3,84-5,74%. В крови мужчин встречаемость ядер гранулоцитов с отростками, подобными типу В, не превышает 0,44%.

Вопрос о природе полоспецифических отростков в крови у женщин до сих пор окончательно не выяснен, но имеются доказательства связи их с X-хромосомой. Выявляемость полоспецифических отростков зависит от степени сегментации ядер гранулоцитов. Так, при пельгеровской аномалии лейкоцитов и болезни Дауна, когда нарушен процесс сегментации ядер, полоспецифические отростки не определяются. Отсутствуют они и при синдроме Шерешевского-Тернера (хромосомный набор 45X0). При сдвиге

лейкоцитарной формулы влево частота обнаружения полоспецифических отростков снижается и, наоборот, увеличивается при сдвиге формулы вправо.

Для выявления отростков гранулоцитов могут быть использованы азур-эозиновые смеси, основные красители и флюорохромы. В связи с низкой частотой встречаемости ядер лейкоцитов с полоспецифическими отростками, а также с часто ограниченным числом ядер гранулоцитов в следе, для диагностики половой принадлежности крови по полоспецифическим отросткам наиболее эффективным является применение метода последовательного анализа Вальда.

11.6. Комплексное исследование биосубстрата по делам о половых преступлениях

При проведении судебно-медицинских экспертиз по делам о половых преступлениях, когда объектами исследования служат смывы и мазки-отпечатки с половых органов подозреваемых в совершении преступления мужчин, возникает необходимость обнаружения в них клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия (буккальных, вагинальных, ректальных), установления их региональной, половой, антигенной принадлежности, генетического профиля и возможности их происхождения от конкретных лиц, проходящих по делу.

Схема исследования биосубстрата в мазках-отпечатках и в осадке из смыва с полового члена предполагает комплексный экспертный подход.

При проведении экспертиз по делам о половых преступлениях обязательным объектом исследования при задержании подозреваемого лица мужского пола, являются мазки-отпечатки на предметных стеклах и смыв с полового члена на марле.

При этом на первом этапе цитологического исследования осуществляется флюорохромирование препаратов раствором флюорохрома акрихина. После чего с применением люминесцентной микроскопии производится поиск и обнаружение клеток, содержащих пригодные ядра, в которых устанавливается наличие мужской половой метки – Y-хроматина.

Для решения вопроса о половой принадлежности клетки ее ядро должно отвечать следующим требованиям: а) четкость контуров ядер без изменения формы; б) нежная хроматиновая сеть ядра; в) отсутствие наложений микроорганизмов, посторонних примесей и клеток друг на друга.

Для выявления X-хроматина в ядрах может быть использована окраска флюорохромами, азур-эозиновыми смесями и основными красителями.

На втором этапе цитологического исследования, посредством световой микроскопии производится поиск клеток с сохранившейся клеточной мембраной, основными структурами цитоплазмы и ядра, изучаются их морфометрические характеристики, устанавливается половая принадлежность по X-хроматину и определяется их региональная принадлежность. Окраска препаратов акридиновым оранжевым позволяет изучить морфологические характеристики клеток по цитохимическим признакам, определить наличие в них X-хроматина. Окраска амидочерным 10Б позволяет установить наличие в клетках белковых включений, окраска раствором Люголя – присутствие в цитоплазме клеток гликогена. Окраска препаратов азур-эозиновой смесью завершает установление регионального происхождения клеток, а также позволяет выявить в препаратах сперматозоиды.

На третьем этапе цитологического исследования, после установления регионального происхождения обнаруженных эпителиальных клеток (вагинальных, буккальных или ректальных), производится определение в них группоспецифических антигенов системы АВ0 с помощью РСА.

РСА как и РАЭ, основана на том, что молекула АТ имеет по крайней мере две валентности или два активных центра, способных соединяться с соответствующими антигенными детерминантами. РСА не сопровождается искусственной диссоциацией комплексов антиген – антитело, а заключается в использовании свободных активных центров абсорбированных антигеном антител для агглютинации тест-эритроцитов той же групповой специфичности. Принципиальным различием в подходе к проведению РАЭ и РСА является то, что для успешного проведения РАЭ необходимо максимально усиливать искусственную диссоциацию комплексов антиген – антитело, а для проведения РСА – максимально ограничить спонтанную диссоциацию этих комплексов [17]. Поскольку молекулы АТ имеют либо две валентности (Ig класса G), либо – 5-10 валентностей (Ig класса M), при определенных условиях, а именно, при избытке АТ, можно добиться того, что одна из двух или часть валентностей мультвалентного АТ будет связываться с гомологичным АГ пятна или изолированной клетки. Другая половина валентностей этого же АТ останется свободной и впоследствии соединится с гомологичными тест-эритроцитами, которые и будут выступать в роли

индикатора реакции. При этом эритроциты через общие АТ прочно соединяются с объектом и выглядят, как нитка бус, лежащая вдоль края клетки. Такая картина характерна для проявления АТ класса IgG. АТ класса IgM образуют более крупные агглютинаты, подвижно привязанные к объекту исследования; такие агглютинаты выглядят как «шарики на нитке». Таким образом, при достаточно сильном АГ образуются агглютинаты, прикрепленные к объекту. Положительный результат реакции в виде фиксированных агглютинатов или цепочки из тест-эритроцитов означает, что в объекте есть гомологичный антиген. РСА – сложная иммунологическая реакция антиген – антитело, которая состоит из двух простых реакций: абсорбции, когда АГ клетки связывает часть валентностей АТ диагностического реагента и реакции агглютинации своеобразной формы, когда АТ, соединенные с АГ исследуемого объекта, в то же время присоединяют (агглютинируют) стандартные тест-эритроциты. Эти две реакции идут последовательно, но наблюдаются одновременно.

В РСА участвуют три иммунологических компонента:

- 1) АГ исследуемого объекта (клетки);
- 2) АТ диагностической сыворотки, связанные одновременно с АГ двух разных объектов;
- 3) АГ тест-эритроцитов.

В РСА АТ находятся в связи как с объектом, так и с тест-эритроцитами, элюция АТ в РСА недопустима. Техника постановки РСА подробно изложена в методических рекомендациях.

РСА состоит из двух этапов: на первом этапе происходит специфическое связывание АГ клеточных мембран гомологичных АТ, а на втором этапе (после отмывания несвязавшихся АТ) происходит индикация реакции антиген – антитело на клетках с помощью одноименных к использованным АТ эритроцитов.

11.7. Комплексное исследование многокомпонентных пятен

В настоящее время экспертиза объектов биологического происхождения, является сложным комплексным исследованием с участием специалистов различного профиля, что требует выработки тактики проведения конкретной экспертизы, выбора способов пробоподготовки, методов исследования и порядка их использования.

В практической работе применяется комплексный подход к исследованию биологических объектов. Он предполагает использование различных схем в зависимости от характера исследуемого объекта.

Многокомпонентное пятно, подвергаемое комплексному исследованию, может содержать кровь, выделения человека (пот, слюну, сперму) и эпителиальные клетки. Если структура объекта позволяет, следует с помощью соответствующей пробоподготовки разделить выделенный из него биологический материал на составные части и исследовать их параллельно различными методами: цитологическими, иммунологическими и генетическими.

На завершающих этапах экспертизы полученные результаты объединяют, анализируют и формулируют совместные выводы.

12. РЕКОМЕНДАЦИИ ПРИ ОФОРМЛЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ СУДЕБНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ И СУДЕБНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспертиза крови

Установление наличия крови

Осмотр в ультрафиолетовых лучах: Исследованию подвергали представленные предметы, в лучах УФЛ с помощью специальной лампы, при этом были обнаружены (не обнаружены) участки коричневатого бархатистого тусклого свечения.

Исследование с помощью диагностических полосок. Кусочки (вырезки) из пятен ... цвета, на представленном предмете заливали физиологическим раствором на 20-48 часов, экстрагировали в условиях холодильника при температуре +4°C. Вытяжки по 1 капле из каждого объекта исследования наносили на отдельную тест-полоску, результат учитывали в течение первых 5 минут.

Результаты исследования: при положительном результате отмечается окрашивание зеленоватого цвета, при отрицательном результат полоска свой цвет не изменяет.

Микроспектральный метод. Исследуемые кусочки (вырезки), соскобы, смывы из области пятен ... цвета, помещали на предметные стекла (ткань разволокняли, а соскоб слегка раздавливали скальпелем) и обрабатывали: 1) 33% раствором едкого натра и многосернистым аммонием, и 2) концентрированной серной кислотой. Исследование производили с помощью микроскопа ... (ок. ..., об...х) с использованием микроспектроскопа. *Результаты исследования:* при микроспектральном исследовании в исследуемых пятнах ... цвета получен спектр гемохромогена, гематопорфирина – объекты ..., либо ни в одном из изготовленных препаратов спектров гемохромогена и гематопорфирина получено не было.

Микролюминесцентный метод. Дополнительно вырезки из различных участков вещественных доказательств обрабатывали концентрированной серной кислотой и исследовали под люминесцентным микроскопом при установленных для подобного исследования режимах. *Результаты исследования:* глыбки с оранжево-красным свечением, в которых

установлен спектр люминесценции гематопорфирина (характерный для крови), не найдены ни в одном из препаратов.

Метод тонкослойной хроматографии (вариант № 1). Кусочки (вырезки) ткани или смывы на ниточки марли из пятен на предмете-носителе ... цвета, участков без видимых пятен экстрагировали дистиллированной водой в течение 20 часов, в холодильнике при температуре +4°C, затем пробирки центрифугировали при 1500 об./минуту в течение 3 минут. В качестве контроля использовали образец заведомой крови. Вытяжки пятикратно наносили на стартовую линию силуфоловой пластины, которую помещали в камеру с универсальным растворителем состава: бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 4:1:2. По достижении фронтом растворителя противоположного конца, пластину высушивали и проявляли последовательно азопиромом и окислителем. *Результаты исследования:* положительный результат – появление зон гемина в виде пятен фиолетового цвета, расположенных у линии финиша, наблюдался в образце заведомой крови и в об. ..., с остальными вытяжками наблюдался отрицательный результат – отсутствие зоны окрашивания.

Метод тонкослойной хроматографии (вариант № 2). Из указанных вырезок с помощью дистиллированной воды готовили вытяжки. Время экстрагирования – 20 часов при температуре +4°C. По капле испытуемых (многократно послойно) и контрольной вытяжек наносили на силуфоловую пластину, последнюю прогревали при температуре 100°C в течение 15 минут и на 20 минут помещали для разделения в камеру, насыщенную смесью бутанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 4:1:2. После извлечения из камеры пластинку просушивали и последовательно проявляли 0,1% раствором основного подкисленного бензидина и 3% перекисью водорода. *Результаты исследования:* при учете результатов зону голубого окрашивания вблизи финиша, свидетельствующую о присутствии крови, наблюдали лишь на дорожке с вытяжкой из образца заведомой крови. С исследуемыми вытяжками такие зоны отсутствовали.

Установление наличия и принадлежности крови человеку с помощью иммунохроматографического экспресс-теста, основанного на обнаружении гемоглобина человека. Кусочки ткани (смывы на кусочки марли) из области исследованных пятен, участков без видимых пятен заливали прилагаемым к тесту буфером и экстрагировали в течение 2 часов в пробирках при комнатной

температуре. Затем пробирки центрифугировали в течение 3 минут при 1500 об./минуту и супернатант использовали в качестве исследуемого материала. По пять капель вытяжки наносили в округлое углубление тест-кассеты и через десять минут учитывали результат. *Результаты исследования:* положительный результат – появление на тест-кассете двух полос красноватого цвета: в области контроля (С) и в области теста (Т) указывает на то, что в объекте имеется гемоглобин человека; отрицательный результат – появление красноватой полосы только в зоне контроля (С) указывает на отсутствие гемоглобина человека в вытяжках, либо концентрация гемоглобина ниже границы чувствительности.

Установление наличия и принадлежности крови человеку с помощью иммунохроматографического экспресс-теста, основанного на обнаружении гликофорина А человека. Кусочки ткани (смывы на кусочки марли) из области исследованных пятен, участков без видимых пятен заливали прилагаемым к тесту буфером и экстрагировали в течение двух часов в пробирках при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали в течение 3 минут при 1500 об./минуту и супернатант использовали в качестве исследуемого материала. По пять капель вытяжки наносили в округлое углубление тест-кассеты и через десять минут учитывали результат. *Результаты исследования:* положительный результат – появление на тест-кассете двух полос красноватого цвета: в области контроля (С) и в области теста (Т) указывает на то, что в объекте имеется гемоглобин человека; отрицательный результат – появление красноватой полосы только в зоне контроля (С) указывает на отсутствие гемоглобина человека в вытяжках, либо концентрация гемоглобина ниже границы чувствительности.

Определение видовой принадлежности следов крови

Реакция коаггуляционной (Чистовича-Уленгута). Исследованию подвергались вытяжки из об ..., изготовленные из пятен крови на предмете-носителе и контрольные вытяжки из участков предмета-носителя без крови. Вытяжки из пятен крови (об. ...) под контролем пробы Геллера разводили до светло-желтого цвета. В реакции использовали иммунные сыворотки, преципитирующие белок человека «серия ... ЧВ», крупного рогатого скота «серия ... КР», свиньи «серия ... СВ», собаки «с. ... СБ.», кошки «с. ... КШ», проверенные в отношении специфичности и титра. В качестве контроля

использовали заведомый образец крови человека. *Результаты исследования:* в результате взаимодействия преципитирующих сывороток и вытяжек, изготовленных из об ... на предмете-носителе наблюдали образование осадков в виде тонких колец на границе раздела жидкостей (преципитаты) между вытяжками из об. ... и сывороткой преципитирующей белок человека; контроли работали соответствующим образом.

При взаимодействии сывороток и вытяжек, изготовленных из об. ..., наблюдался отрицательный результат реакции – образование осадков в виде тонких колец на границе раздела жидкостей (преципитаты) не отмечалось ни с одной из преципитирующих сывороток. Для лучшего экстрагирования добавляли в вытяжки – 0,01% раствор трипсина и экстрагировали в течение 48 часов. Полученные вытяжки исследовали на присутствие белка (проба Геллера) – результат реакции слабоположительный (отмечалось небольшое выпадение осадка в виде тонких колец). После чего, реакцию кольцепреципитации повторяли. Условия и ход реакции те же. При взаимодействии сывороток и вытяжек наблюдался отрицательный результат реакции – образование осадков в виде тонких колец на границе раздела жидкостей (преципитаты) не отмечалось ни с одной из преципитирующих сывороток.

Реакция преципитации в агаре. Видовую принадлежность пятен крови устанавливали в объектах №№ ... Исследование проводили реакцией преципитации в 1% бессолевом агаровом геле на предметных стеклах (толщина слоя агара 1 мм). Исследованию подвергали вытяжки из объектов ... и контрольные вытяжки из заведомого образца крови человека. Экстрагирование материала в течение 48 часов при температуре +4°C помощью физиологического раствора с добавлением 0,01% раствор трипсина. В реакцию вводили сыворотки, преципитирующие белки крови белок человека «с ... ЧВ», крупного рогатого скота «серия ... КР», свиньи «серия ... СВ», собаки «с ... СБ.», кошки «с ... КШ», проверенные в отношении специфичности и титра. После внесения ингредиентов в лунки агарового геля препараты сохраняли во влажных камерах в течение 3 суток (в холодильнике). *Результаты исследования:* отмечено появление полос преципитации между вытяжками из об. ... и сывороткой, преципитирующей белок человека.

Метод встречного иммуноэлектрофореза. Видовую принадлежность крови в пятнах на ... (об. ...), устанавливали реакцией электропреципитации.

Вырезки (кусочки) из вышеуказанных пятен и контрольных участков предмета-носителя, экстрагировали дистиллированной водой в течение 20 часов в условиях холодильника при температуре +4°C. Реакция ставилась на агаровом геле в трисовом буфере, при силе тока 25-30 мА, напряжении 220 V в течение 30 минут. Использовали иммунные сыворотки, преципитирующие белок крови человека (с. ...), рогатого скота (с. ...), свиньи (с. ...), ... предварительно проверенные в отношении титра и специфичности. *Результаты исследования:* положительный результат – образование преципитатов в виде дуг были получены при взаимодействии вытяжек из пятен крови на ... (об. ...), с сывороткой преципитирующей белок крови человека; отрицательный результат – отсутствие дуг преципитата, наблюдался с вытяжками из контрольных участков.

Проба Геллера. В случае отрицательного результата реакций по определению видовой принадлежности содержание белка в вытяжках проверяют пробой Геллера. Капиллярный конец пастеровской пипетки в вертикальном положении опускают в пробирку с вытяжкой и набирают небольшое количество вытяжки. Пипетку вынимают из пробирки, конец осторожно вытирают, после чего капиллярный конец пипетки почти в горизонтальном положении опускают в концентрированную азотную кислоту, налитую на часовое стекло. Пипетку вынимают из кислоты. *Результаты исследования:* в месте контакта вытяжки и кислоты при положительном результате реакции – образуется осадок белка вытяжки.

Установление видовой принадлежности крови на вещественных доказательствах методом иммуноферментного анализа. Видовую принадлежность белка в объекте № 1 устанавливали методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно Методике, изложенной Сидоровым В.Л. и соавт. в медицинской технологии «Установление видовой принадлежности биологических объектов по IgG человека с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа» – М., – 2011. – 15 с. (Разрешение на применение новой медицинской технологии ФС № 2011/354 от 16.11.2011). Методика исследования: в лунки 96 луночного полистирольного планшета с иммобилизованными антителами анти-IgG человека добавляли по 90 мкл рабочего раствора для разведения сывороток (вытяжек). Затем в лунки добавляли по 10,0 мкл отрицательного контроля

(раствор, используемый для экстрагирования вытяжек, и стандартная калибровочная проба 0 мг/мл IgG_{общ.}), стандартных калибровочных проб для расчета концентрации (от 1 до 25,00 мг/мл IgG_{общ.}), контрольной сыворотки, содержащей IgG_{общ.}, а также исследуемых вытяжек из объекта № ... Время инкубации – 30 минут при температуре 37°C на шейкере. После чего в лунки добавляли по 100 мкл конъюгата (антитела анти – IgG_{общ.} меченые пероксидазой хрена) и вновь инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C на шейкере. Образовавшийся комплекс выявляли ферментативной реакцией с использованием раствора тетраметилбората. Реакцию останавливали стоп-реагентом после 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Отмывание от несвязавшихся компонентов на первом и втором этапе реакции проводили на автоматическом вошере. *Результаты исследования:* учет результатов производили с помощью ридера. В результате реакции: в исследуемом объекте № 1 значение оптической плотности составило 0,0230. Оптическая плотность в отрицательном контроле – 0,000-00,0010 (бланк и концентрация 0 мг/мл), в калибровочных пробах оптическая плотность находилась в пределах от 0,0810 (в стандартной калибровочной пробе 1 мг/мл IgG_{общ.}) до 2,4420 (в стандартной калибровочной пробе 25,00 мг/мл IgG_{общ.}), в контрольной сыворотке, содержащей IgG (в стандартной калибровочной пробе 3,00-5,80 мг/мл IgG_{общ.}) – 0,2444. Поскольку в тех исследуемых вытяжках, где концентрация IgG_{общ.} выше, чем в минимальной калибровочной пробе (с концентрацией IgG 1 мг/мл – 0,0880), результат оценивается как положительный, а в объекте № 1 концентрация IgG_{общ.} превышает это значение, установлена принадлежность крови в нем человеку.

Установление групповой принадлежности жидкой крови по системе АВ0

а) *Реакция агглютинации на плоскости.* Выявление антигенов А, В и Н в образцах крови проходящих по делу лиц ... производили реакцией агглютинации на плоскости, где смешивали по 1 большой капле (100 мкл) стандартных моноклональных сывороток анти-А, анти-В и анти-Н с одной маленькой каплей (20 мкл) испытуемых эритроцитов, отмытых в 0,9% растворе хлорида натрия. Учитывали результаты визуально по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов после перемешивания и покачивания в течение времени специфичности (5 минут). Отрицательным результатом

считается, если суспензия осталась гомогенной и агглютинаты визуально не наблюдаются.

При учете результатов наблюдалось:

– в образце жидкой крови потерпевшей, промаркированной № ..., четко выраженная агглютинация наблюдалась с Цоликлоном анти-Н, с Цоликлонами анти-А и анти-В – агглютинация не обнаружена.

– в образце жидкой крови проходящего по делу, промаркированной № ..., четко выраженная агглютинация наблюдалась с Цоликлоном анти-Н и Цоликлонами анти-А, с Цоликлоном анти-В – агглютинация не обнаружена.

б) *Прямая реакция агглютинации в пробирках (по Шиффу).* Исследование образцов крови проходящих по делу лиц ... производили двойным способом, т.е. сыворотку и эритроциты испытуемой крови исследовали по отдельности. В две пробирки (с соответствующими обозначениями цветными карандашами) помещали по 2 капли стандартных изосывороток β , α и по 4 капли 1% взвеси испытуемых эритроцитов. В другие две пробирки (также соответственно обозначенные) помещали по 2 капли испытуемой сыворотки и по 4 капли 1% взвеси стандартных эритроцитов групп $A\beta$, $B\alpha$. После этого пробирки центрифугировали в течение 3 минут при 1500-2500 об./минуту. Потом пробирки хорошо встряхивали и содержимое их рассматривалось макроскопически при хорошем освещении. При отсутствии агглютинации или неясных результатах содержимое пробирок переносили на предметные стекла; результат учитывали с помощью микроскопа «...» (ок. $10\times$, об. $10\times$). *Результаты исследования:* установлено, что эритроциты крови потерпевшей ... не агглютинируются стандартными сыворотками альфа и бета, а сыворотка ее крови агглютинирует стандартные эритроциты А и В; эритроциты крови проходящего по делу ... агглютинируются стандартной сывороткой альфа и не агглютинируются стандартной сывороткой бета, а сыворотка его крови агглютинирует стандартные эритроциты В и не агглютинирует стандартные эритроциты А.

Установление групповой принадлежности крови в пятнах по системе АВ0

Реакция абсорбции агглютининов в количественной модификации.

Выявление антигенов А и В производили в образце крови трупа на марле с использованием сывороток альфа и бета с титром 1:32, проверенных в

отношении специфичности. Соотношение исследуемого материала и сывороток: 25 мг и 0,15 мл. Абсорбция в холодильнике в течение 20 часов, титрование абсорбированных сывороток – в пробирках в кратных разведениях с 1% взвесью стандартных эритроцитов групп А β и В α , с последующим центрифугированием 4 минуты при 1500 об./минуту, и микроскопическим учетом результатов с помощью микроскопа ... (ок. 10 \times , об. 10 \times). Результаты исследования приведены в таблице 6.

Метод абсорбции-элюции. Выявление антигенов системы АВ0 производили в образце крови трупа на марле (не отмытом и отмытом в физиологическом растворе хлорида натрия). В качестве контролей исследовались образцы крови групп А β , В α , О $\alpha\beta$. Ниточки марли из пятен крови длиной до 10 мм, погружали в этиловый спирт на 20 минут для фиксации. Затем материал высушивали при комнатной температуре. Для абсорбции использовали изогемагглютинирующие сыворотки анти-А (альфа) серия № ... анти-В (бета) серия № ... в титре 1:64, моноклональную анти-Н серия №... в титре 1:32 в кратном разведении, проверенных в отношении специфичности и титра (активности). Абсорбция в планшете при температуре +4 $^{\circ}$ С в течение 20 часов, с последующей постановкой пробы на истоощаемость сывороток (к капле абсорбированной сыворотки добавляли по 1 капле 1% взвеси соответствующих стандартных эритроцитов с последующим центрифугированием и макро- и микроскопическим учетом результатов). После удаления сыворотки материал промывали ледяным физиологическим раствором; к отмытому материалу на предметные стекла (с соответствующими обозначениями цветными карандашами) добавляли 2 капли 0,25% взвеси эритроцитов групп А β , В α и О $\alpha\beta$; помещали во влажные камеры в термостат на 20 минут при температуре +56 $^{\circ}$ С для элюции. Затем препараты выдерживались в тех же влажных камерах 2 часа при комнатной температуре. Учет результата с помощью микроскопа «...» (ок. 10 \times , об. 10 \times) на предметных стеклах под покровными стеклами. Результаты исследования приведены в таблице 6.

Определение группы крови в пятне

Объекты исследования	КРА		Проба на истощаемость		РАЭ					Метод покровного стекла			Результат
	изосыворотки				изосыворотки					стандартные эритроциты			
	α	β	α	β	α	β	α	β	a-H	A	B	O	
Контроль марли	-	-	+	+	-	-	-	-	-				-
Образец крови гр. A β	4	-	+	+	+	-	+	-	+				A, H
Образец крови гр. B α	-	4	+	+	-	+	-	+	+				B, H
Образец крови гр. O $\alpha\beta$	-	-	+	+	-	-	-	-	+				H
Образец крови от трупа ... не отмытый	4	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	A β , H A, H
Образец крови от трупа ... отмытый в физ. растворе.			+	+	+	-	+	-	+				

Примечание: знак «+» - обозначает наличие агглютинации эритроцитов, знак «-» - обозначает отсутствие агглютинации эритроцитов, цифры обозначают степень поглощения агглютининов сыворотки.

После исследования кровь на марле из трупа ..., передана в архив отделения.

Результаты исследования: кровь на марле от трупа ..., относится к группе A β , с сопутствующим антигеном H.

Определение групповой принадлежности крови по системе гаптоглобина.

Определение типов H_p производили в образцах крови трупа неизвестного мужчины ..., крови проходящих по делу ..., на марле и в пятнах крови на предмете-носителе (об...) методом электрофореза в вертикальных пластинах 7% полиакриламидного геля в трис-глициновой буферной системе. В качестве контроля использовали вытяжки из образцов крови с заведомо известными типами H_p: H_p 1-1; H_p 2-1; H_p 2-2. Экстрагирование производили в буфере для экстрагирования с последующей обработкой вытяжек хлороформом. Электрофорез проводили в течение 4 часов при постоянном токе 90 мА и температуре 4°C, до вхождения в разделяющий гель, затем ток

повышали до 130 Ма. Окраска блока геля проводилась раствором бензидина в 10% уксусной кислоте с добавлением пергидроля. Результаты учитывали по выявлению фракции Нр визуально и сопоставлению их с контрольными образцами. Результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7

Определение типов гаптоглобина

Объекты исследования	Гаптоглобин (Нр)
Образец крови Нр 2-2	2-2
Образец крови Нр 2-1	2-1
Образец крови трупа	2-2
Образец крови	1-1
Образец крови	2-1
Предмет-носитель	
Пятна крови об.	2-2

Определение групповой принадлежности жидкой крови по системе MNSs

Антигены М и N в эритроцитах крови ... выявляли реакцией гемагглютинации на плоскости со стандартными гетероиммунными сыворотками анти – М и анти-N. К 2 каплям каждой тест-сыворотки добавляли по 1 капле отмытых исследуемых эритроцитов в соотношении 10:1. После тщательного перемешивания в течение 5 минут учитывали результаты макро- и микроскопически. При учете результатов отмечали агглютинацию

Определение групповой принадлежности пятен крови по системе MNSs

Антигены М и N в объектах № ..., контрольных участках к ним, образцах крови групп OM, ON, OMN, образцах крови на марле – выявляли реакцией абсорбции-элюции с помощью стандартных гетероиммунных сывороток анти-М и анти-N в титре 1:16. При работе с сывороткой анти-М объекты фиксировали в течение 15 минут 96° этанолом. Абсорбция протекала в течение 18 часов при температуре 4°С. Отмывание от неабсорбированных антител осуществляли охлажденным физиологическим раствором, подобрав число отмываний предварительно по образцам. Элюцию проводили на предметных стеклах во влажных камерах в 0,05% взвесь тест-эритроцитов OM и ON на 1% альбумине при температуре 50°С в течение 30 минут с последующей экспозицией препаратов при комнатной температуре в течение 3 часов. Учет результатов – микроскопический. Результаты исследования: наблюдали

агглютинацию тест-эритроцитов группы OM в элюатах из объектов № ..., образца крови ...; группы ON – в образце крови ..., об. №

Экспертиза выделений

Установление наличия спермы

Поиск следов спермы в ультрафиолетовых лучах. Для обнаружения невидимых следов, подлежащих исследованию на представленном предмете одежды, использовали диагностический люминесцентный осветитель с рабочей длиной волны 356 нм. *Результаты исследования:* при использовании ультрафиолетовой лампы, были выявлены участки ткани, на которых имелись слабо видимые следы, которые отображались светло-голубым свечением, характерным для пятен спермы, из которых производились вырезки для исследования.

В случае, если на данном предмете исследования видимых пятен не обнаружено, он может быть осмотрен в естественном освещении и с помощью источника криминалистического света, в спектральном диапазоне 415-440 нм (фиолетовый и голубой диапазон, соответственно), характерном для обнаружения флуоресцирующих следов (семенная жидкость, кровь, пот, слюна и т.п.). При осмотре на предмете исследования могут отмечаться участки и пятна слабонасыщенного беловатого свечения, из которых необходимо произвести вырезки для проведения дальнейших исследований.

Реакция задержки агглютинации эритроцитов фитагглютинами картофельного сока. Кусочки (вырезки) из пятен и помарок на ..., контрольный образец заведомой спермы экстрагировали физиологическим раствором в течение суток в условиях холодильника при температуре +4°C. Затем к 1 капле каждой вытяжки добавляли по 1 капле 1% взвеси стандартных эритроцитов группы O и по 1 капле сока из клубней картофеля, разведенного до титра 1:32. Смеси центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об./минуту. Результаты исследования: задержка агглютинации наблюдалась в 2-х вытяжках из пятен на ..., а также с вытяжкой из заведомого пятна спермы.

Установление наличия спермы с помощью тест-полосок на общую кислотную фосфатазу. Кусочки (вырезки) из ..., экстрагировали дистиллированной водой в течение 30 минут. По капле вытяжки наносили на тест-полоски. Для контроля использовали вытяжку из контрольного образца спермы. Положительный результат – окрашивание насыщенного фиолетового

цвета отмечали с вытяжкой контрольного образца спермы и в об. ... на ... Отрицательный результат – изменение цвета в исследуемых пятнах не наблюдали.

Иммунохроматографический анализ с помощью полуколичественного иммунохроматографического экспресс-теста для определения простатоспецифического антигена (ПСА). Кусочки (вырезки) (ткани ..., марли из тампонов с содержимым ...), экстрагировали буферным раствором с нейтральным рН в течение двух часов при комнатной температуре. После 3-х минутного центрифугирования при 1500 об./минуту, надсадочную жидкость разводили 1:50 (для избежания Хук-эффекта), по 5 капель вносили в округлое углубление тест-кассеты. После экспозиции в течение 10 минут учитывали результат. *Результаты исследования:* положительный результат – в результате реакции наблюдали появление трех красноватых полос в зоне контроля С, в зоне внутреннего стандарта и в зоне теста Т с вытяжками из пятен на ... (об. ...); отрицательный результат – в результате реакции наблюдали образование двух красноватых полос в зоне контроля С и в зоне внутреннего стандарта, в зоне теста Т полоса положительного результата на наличие спермы (Т) отсутствовала.

Иммунохроматографический анализ с помощью иммунохроматографического экспресс-теста для определения семеногелина человека. Семеногелин – белок, вырабатываемый семенными пузырьками, определяет степень густоты семенной жидкости при эякуляции. Тест является специфичным, не реагирует со слюной, цельной кровью, вагинальным секретом, менструальной кровью, грудным молоком и мочой. Не выявлено перекрестной реакции с семенной жидкостью животных: собакой, кошкой, мышью, коровой, лошадью, козлом, бараном. Кусочки (вырезки) (ткани ..., марли из тампонов с содержимым ...), экстрагировали буферным раствором с нейтральным рН в течение двух часов при комнатной температуре. После 3-х минутного центрифугирования при 1500 об./минуту, надсадочную жидкость разводили 1:20 (для избежания Хук-эффекта), по 5 капель вносили в округлое углубление тест-кассеты. После экспозиции в течение 10 минут учитывали результат. *Результаты исследования:* положительный результат – в результате реакции наблюдали появление трех красноватых полос в зоне контроля С, в зоне внутреннего стандарта и в зоне теста Т с вытяжками из пятен на ... (об. ...); отрицательный результат – в результате реакции

наблюдали образование двух красноватых полос в зоне контроля С и в зоне внутреннего стандарта, в зоне теста Т полоса положительного результата на наличие спермы (Т) отсутствовала.

Морфологические методы установления наличия сперматозоидов

Морфологический метод установления наличия сперматозоидов экспресс-методом (Корен-Стокиса). Волокно или маленький кусочек, вырезанный из средней части исследуемого пятна, помещали на предметные стекла и наносили 2-3 капли 0,5% раствора эритрозина в аммиаке (0,5 г эритрозина на 100 мл 25% раствора аммиака). Через 30 секунд волокно или кусочки материи переносили в одну-две капли дистиллированной воды и препаровальной иглой расщепляли. *Результаты исследования:* препарат накрывали покровным стеклом и микрофотографировали с помощью микроскопа ... (об. ... х), в препарате из пятна ... цвета найдены единичные сперматозоиды (об. ...) или ни в одном из препаратов сперматозоиды не найдены.

Морфологический метод (окраска по Романовскому-Гимзе). Из пятен и участков, расположенных на ... вырезали кусочки ткани, которые помещали в пробирки и с избытком заливали 10% раствором уксусной кислоты. Экстрагирование 20 часов в условиях холодильника при температуре +4°C. Исследовали осадок после центрифугирования при 2000 об./минуту, из которого готовили препараты на обезжиренных предметных стеклах. После подсушивания, фиксации этиловым спиртом, препараты окрашивали 0,1% водным раствором азур-эозиновой смесью в течение 20-30 минут, краску смывали дистиллированной водой, просушивали, далее мазки подвергали микроскопии с масляной иммерсией на микроскопе ... (ок.10 × 18 об.10×0,25). *Результаты исследования:* при микроскопическом исследовании установлено: в исследуемых препаратах обнаружены сперматозоиды (об. ...). (ни в одном из исследуемых препаратов сперматозоиды не обнаружены).

Морфологический метод концентрированного извлечения сперматозоидов (по Серопяну). Из пятна ... цвета вырезали кусочек 1×1см, разволокняли. Расщепленный материал переносили в пробирки и заливали 10% раствором аммиака на 20 часов при температуре +4°C. Затем пробирки центрифугировали при 1000 об./минуту в течение 5 минут. Надосадочную жидкость удаляли. Осадок помещали на предметные стекла, высушивали, окрашивали аммиачным раствором эритрозина, микрофотографировали с

использованием микроскопа ... (ок.10×18 об.10×0,25). *Результаты исследования:* при микроскопическом исследовании установлено: в исследуемых препаратах обнаружены сперматозоиды. (ни в одном из исследуемых препаратов сперматозоиды не обнаружены).

Морфологический метод концентрированного извлечения сперматозоидов (по Серопяну). Кусочки ткани ... помещали в пробирки, заливали 5% раствором аммиака и экстрагировали в течение 20 часов при комнатной температуре. Вытяжки центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/минуту. Осадок переносили на предметные стекла и высушивали при комнатной температуре. Окраска изготовленных препаратов производилась 1% раствором солянокислого фуксина. Микроскопическое исследование производилось на микроскопе «ок.15×, об.40×». *Результаты исследования:* при микроскопическом исследовании ни в одном из изготовленных препаратов сперматозоиды не обнаружены. ... в об. ... обнаружены сперматозоиды

Колориметрический метод. Установление наличия общей кислой фосфатазы в следах на вещественных доказательствах. Установление наличия общей кислой фосфатазы в следах на вещественных доказательствах производили согласно Методике, изложенной Сидоровым В.Л. и соавт. в методических рекомендациях «Установление наличия спермы на вещественных доказательствах по кислой фосфатазе колориметрическим методом» – М., – 2012. – 13 с. Вырезки из всех обнаруженных на приборе следов на рубашке (в том числе из объекта №1), а также смывы со всех обнаруженных следов на ковре заливали дистиллированной водой с рН=7,4 с небольшим избытком, экстрагировали в течение 20 часов при температуре 4°C. Затем вытяжки в количестве по 5 мкл помещали в лунки 96 луночного полистирольного планшета, добавляли по 50,0 мкл субстратной смеси и инкубировали в термошейкере «ST-3» в течение 3 минут при температуре 37°C. Оптическую плотность растворов измеряли двукратно на ридере с трехминутным интервалом. В качестве положительного контроля использовали образец спермы в разведении 1:100. Отрицательным контролем служил образец слюны в разведении 1:2. При этом оптическая плотность отрицательного контроля составила 0,0101-0,0102, положительного контроля (сперма в разведении 1:100) – 0,8138-0,8280. В десяти следах на рубашке значение оптической плотности варьировало от 0,0158 до 0,0300; в

одиннадцати следах на ковре значение оптической плотности составило 0,0150-0,0341, что свидетельствует о присутствии в них общей КФ. Во всех остальных исследуемых вытяжках (в том числе из объекта № 1) оптическая плотность варьировала от 0,0095 до 0,0102, что свидетельствует об отсутствии в них КФ.

Количественный твердофазный иммуноферментный анализ

Определение наличия спермы по выявлению простатического специфического антигена человека. Наличие спермы в десяти участках на рубашке и в одиннадцати участках на ковре устанавливали методом твердофазного иммуноферментного анализа, согласно Методике, изложенной Сидоровым В.Л. и соавт. в медицинской технологии «Установление наличия спермы на вещественных доказательствах по простатическому специфическому антигену человека с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа» – М., – 2011. – 13 с. (Разрешение на применение новой медицинской технологии ФС № 2011/247 от 22.08.2011). Для исследования использовали тест-систему, применяемую в клинической практике для диагностики рака предстательной железы и ряда других заболеваний. *Методика исследования:* В лунки 96 луночного полистирольного планшета с иммобилизованными антителами анти-ПСА добавляли по 100 мкл конъюгата (антитела анти-ПСА, меченые пероксидазой хрена). Затем в лунки добавляли по 20,0 мкл отрицательного контроля (раствор, используемый для экстрагирования вытяжек, и стандартная калибровочная проба 0 нг/мл ПСА_{общ.}), стандартных калибровочных проб (от 1,15 до 34,5 нг/мл ПСА_{общ.}), контрольной сыворотки, содержащей ПСА_{общ.}, а также вытяжек из десяти участков на рубашке и одиннадцати участков на ковре (в разведении 1:50). Время инкубации – 60 минут при температуре 37°C на шейкере. Образовавшийся комплекс выявляли ферментативной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали стоп-реагентом после 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Отмывание от несвязавшихся компонентов реакции проводили на автоматическом вошере. Учет результатов производили с помощью ридера. В результате реакции: в одном исследуемом объекте (тампон с содержимым прямой кишки) значение оптической плотности составило – 0,2732. Оптическая плотность в отрицательном контроле – 0,0000-0,0261, в

положительном контроле оптическая плотность находится в пределах от 0,0871 (в стандартной калибровочной пробе 1,15 нг/мл ПСА_{общ.}) до 0,1948 (в стандартной калибровочной пробе 34,5 нг/мл ПСА_{общ.}), в контрольной сыворотке, содержащей ПСА – 0,1583. Следовательно, в исследуемых следах на тампоне с содержимым прямой кишки трупа обнаружено присутствие ПСА человека. *Результаты исследования:* во всех следах значение оптической плотности варьировало от 0,0156 до 0,0396. Оптическая плотность в отрицательном контроле – 0,0000-0,0314, в положительном контроле оптическая плотность находилась в пределах от 0,0871 (в стандартной калибровочной пробе 1,15 нг/мл ПСА_{общ.}) до 1,6640 (в стандартной калибровочной пробе 34,5 нг/мл ПСА_{общ.}), в контрольной сыворотке, содержащей ПСА – 0,3073. Следовательно, в 10 участках на рубашке и в 11 участках на ковре присутствие ПСА человека не обнаружено.

Определение групповой принадлежности спермы РАЭ. Выявление антигенов системы АВ0 производили в образцах крови проходящих по делу..., ..., ... и в пятнах спермы и выделений на ... потерпевшей ... (об. ...), перенесенных на ниточки марли, путем многократного наслоения, с использованием стандартных изосывороток альфа серии №№ ... и бета серии №№ с титром 1:128, моноклональной анти-Н № с титром 1:16, проверенных в отношении специфичности и титра. Фиксация – кипячением в течение 10 минут, абсорбция – в холодильнике в течение 20 часов с последующей постановкой пробы на истощаемость сывороток (к 1 капле абсорбированной сыворотки добавляли по 1 капле 1% взвеси соответствующих стандартных эритроцитов с последующим центрифугированием и макро- и микроскопическим учетом результатов), отмывание – в лунках микротитратора охлажденным физиологическим раствором хлористого натрия, элюция – в 0,2% взвесь стандартных эритроцитов групп крови А β , В α и О $\alpha\beta$ в термостате при температуре +54°C в течение 20 минут, выдерживание элюата при комнатной температуре в течение 1 часа. Учет результатов после центрифугирования макро- и микроскопический, с помощью микроскопа «...» (ок. 10 \times , об. 10 \times). Результаты реакции – в таблице 8.

Определение групповой принадлежности спермы в пятнах

Объекты исследования	Проба		РАЭ			Выявлены антигены
	α	β	α	β	анти-Н	
Контроль марли	+	+	-	-	-	
Образец крови гр. А β	+	+	+	-	+	А, Н
Образец крови гр. В α	+	+	-	+	+	В, Н
Образец крови гр. О $\alpha\beta$	+	+	-	-	+	Н
Образец крови Ж.	+	+	-	+	+	В, Н
Образец крови С.	+	+	-	-	+	Н
Образец крови К.	+	+	-	-	+	Н
Контроль предмета-носителя	+	+	-	-	-	
Пятна спермы + выделения об. ...	+	+	+	+	+	А, В, Н

Результаты исследования: 1. Кровь Ж. относится к группе В α , с сопутствующим антигеном Н. 2. Кровь С. относится к группе О $\alpha\beta$. 3. Кровь К. относится к группе О $\alpha\beta$. 4. На предмете одежды, изъятом у потерпевшей, обнаружена сперма, без примеси крови, при определении групповой принадлежности которой, выявлены антигены А, В, Н. Такие результаты исследования могли быть получены либо за счет спермы мужчины с группой крови АВ, с сопутствующим антигеном Н, в выделениях которого содержатся соответствующие антигены, либо за счет смешения выделений потерпевшей со спермой мужчины (мужчин) с любой группой крови: А β , В α , О $\alpha\beta$ и АВ, в выделениях которого (которых) содержатся соответствующие антигены. Конкретно высказаться о группе спермы на исследованном предмете одежды ... не представляется возможным, ввиду отсутствия информации о групповой принадлежности крови потерпевшей.

Установление наличия слюны

Реакция на амилазу. Кусочки ткани из области исследуемых пятен, участков без видимых пятен, помещали в пробирки, заливали дистиллированной водой и экстрагировали 20 часов в условиях бытового холодильника при температуре +4°C. Для контроля исследовали образцы заведомой слюны. По истечении указанного времени экстракты переносили в

чистые пробирки и добавляли 2% раствор крахмала. Пробирки помещали в термостат на 3 часа при температуре +37°C, после чего к содержимому пробирок добавляли по 1 капле 0,1% раствора Люголя. *Результаты исследования:* положительный результат – желтоватое окрашивание, наблюдался в контрольном образце заведомой слюны и в об. ... на ... С остальными исследуемыми вытяжками наблюдалось синеватое окрашивание – отрицательный результат реакции.

На предметных стеклах в модификации А. Л. Федоровцева. Смыть с ..., сделанные на кусочки марли, заливались дистиллированной водой с небольшим избытком. Экстрагирование проводили в течение часа при комнатной температуре. Реакцию проводили на стеклах на крахмально-агаровом геле. В лунки помещали вытяжки из пятен, контроля предмета-носителя, образца заведомой слюны, разведенного в 1000 раз. Стеклянные влажные камеры помещали в термостат при температуре +37°C с экспозицией 2 часа. Затем гель окрашивали раствором Люголя. *Результаты исследования:* положительный результат – вокруг лунки с заведомой слюной и со смывом ... (об...) наблюдалась кольцевидная неокрашенная зона различной ширины; отрицательный результат – отсутствие кольцевидного неокрашенного участка в контроле предмета-носителя.

В пробирках по методике Л.О. Барсегянц. Кусочки (вырезки) ткани или смывы на ниточки марли из пятен и контрольных участков предмета-носителя, контрольного образца заведомой слюны в отдельных пробирках заливали толуолом. Время экспозиции 4 часа при комнатной температуре. Затем в пробирки добавляли по 5 мл 2% картофельного крахмала, приготовленного на 2% растворе хлористого натрия. Пробирки помещали в термостат при температуре 37°C на 20 часов. После чего из каждой пробирки половину жидкости переносили в чистую пробирку и добавляли к ней по 1 капле раствора Люголя, разведенного дистиллированной водой 1:3. *Результаты исследования:* положительный результат – жидкость в пробирке с контрольным образцом слюны и в пробирках с вытяжками из пятен на ... (об. ...) осталась прозрачной; отрицательный результат – с контрольными участками предмета-носителя наблюдалось мутное синее окрашивание.

Иммунохроматографический анализ. Определение наличия слюны по α -амилазе слюны человека. Вырезы кусочков ткани с различных участков ... (в

том числе из участков, обозначенных объектами ... – помещали в пробирки и инкубировали в 200 мкл универсального буфера, прилагаемым к тесту, в течение двух часов при комнатной температуре. Затем от полученного экстракта отбиралось по 20 мкл и смешивалось с 80 мкл Универсального буфера. Полученный объем (100 мкл) вытяжки наносили в окно для образца тест-кассеты и через десять минут учитывали результат. Оставшийся экстракт сохраняется для последующих исследований. В качестве положительного контроля использовали слюну человека; в качестве отрицательного контроля – вытяжку из кусочка стерильной марлевой салфетки, смоченной 100 мкл универсального буфера. *Результаты исследования.* Положительный результат (α -амилаза слюны человека присутствует в пробе) – появление двух полос красного цвета; одна – в области контроля (С), другая – в области результата (Т).

Колориметрический метод. Установление наличия слюны на вещественных доказательствах колориметрическим методом по α -амилазе. Исследованию проводят с помощью тест-набора, применяемого для исследования сывороток крови в клинических и диагностических целях. Принцип метода: α -амилаза гидролизует CNP-олигосахарид с образованием CNP (2-хлор-4-нитрофенол). Скорость образования CNP прямо пропорциональна активности α -амилазы в пробе. Методика исследования: в лунки 96 луночного полистирольного планшета добавляли отрицательные контроли (дистиллированная вода 100 мкл (фон) и калибровочная проба 0 Е/л – 5 мкл дистиллированной воды), приготовленных калибровочных проб для расчета активности (от 180 до 7000 Е/л), контроля активности, содержащего амилазу с активностью 900-2000 Е/л. Затем вытяжки в количестве по 5,0 мкл вносили в лунки 96 луночного полистирольного планшета. После этого во все лунки, кроме А1, добавляли по 200 мкл раствора CNP-олигосахаридов. Время инкубации – 1 минута при температуре 37°C на шейкере. Оптическую плотность растворов измеряли трехкратно на ридере с минутным интервалом. *Результаты исследования:* в одной группе следов на рубашке значение оптической плотности составило 0,1398 (активность α -амилазы – 219,5105). Во всех остальных следах и участках значение оптической плотности варьировало от 0,0414 до 0,0629 (активность α -амилазы 65,0053 – 98,7640 Е/л). Оптическая плотность в отрицательном контроле – 0,0000-0,0296 (бланк и

активность 0 Е/л), в калибровочных пробах оптическая плотность находилась в пределах от 0,1280 (в калибровочной пробе с активностью 201 Е/л) до 3,5000 (в калибровочной пробе с активностью 5496 Е/л), в контроле активности, содержащем амилазу с активностью 900-2000 Е/л – 0,8274. Поскольку в тех исследуемых вытяжках, где оптическая плотность выше, чем в минимальной калибровочной пробе (с активностью 201 Е/л – 0,1280), результат оценивается как положительный, а в одной группе следов на рубашке оптическая плотность выше этого значения (0,1398), в ней установлено ориентировочное наличие слюны. В следах на ковре ориентировочное наличие слюны не установлено.

Установление наличия пота. Метод тонкослойной хроматографии. Кусочки ткани (смывы на ниточки марли ...) из области исследуемых пятен, участков без видимых пятен помещали в пробирки, заливали дистиллированной водой и экстрагировали в течение 20 часов в условиях холодильника при температуре +4°C. В качестве контроля исследовали заведомый образец пота. Вытяжки, после центрифугирования, наносили на стартовую линию силуфоловой пластины, которую помещали в камеру с универсальным растворителем состава: бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 4:1:2, после приближения фронта растворителя к противоположному концу, пластину просушивали и обрабатывали 1% раствором нингидрина в этаноле. Для проявления пластину помещали в термостат при температуре +56°C на 15 минут. *Результаты исследования:* положительный результат реакции – выявление аминокислоты серина в виде сиренево-розового пятна, соответствующего уровню «метчика» – стандартному раствору аминокислоты серина, наблюдалось на полосе с пятном заведомого пота, взятого для контроля, $R_f \approx 0,23$ и в об. ... отрицательный результат – во всех исследуемых пятнах наблюдалось отсутствие зон окрашивания.

Установление наличия мочи. По креатинину. Кусочки (вырезки) ткани (смывы на ниточки марли) из области пятен, контрольных участков предмета-носителя и кусочков марли, пропитанных мочой, помещали в толуол (для предотвращения перехода в вытяжку красителей и окрашенных загрязнений с вещественных доказательств). Через 5 минут толуол удаляли, а к

исследуемому материалу добавляли 2% раствор уксусной кислоты с незначительным избытком. Содержимое пробирок нагревали 3 мин с небольшими перерывами, не доводя до кипения. После чего жидкость из каждой пробирки переносили в чистые пробирки, охлаждали до комнатной температуры и добавляли по 6 капель 10% раствора едкого натра и по 10 капель 1% водного раствора нитропруссид натрия. После перехода получившегося красно-оранжевого окрашивания в желтое, добавляли по 10 капель ледяной уксусной кислоты и кипятили еще 10 минут с небольшими перерывами. *Результаты исследования:* положительный результат – появление сине-зеленого окрашивания жидкости, находящейся в контакте с пятном мочи и исследуемым материалом; отрицательный результат – экстракт из контрольного участка предмета-носителя окраски не изменил.

Метод тонкослойной хроматографии (по мочеvine). Кусочки (вырезки) (смывы на ниточки марли) из пятен на ... и контрольных участков предмета-носителя, экстрагировали дистиллированной водой в течение 20 часов в условиях холодильника при температуре +4°C. В качестве контроля использовали образец заведомой мочи. Вытяжки центрифугировали и пятикратно наслаивали на стартовую линию силикофолевой пластины, которую помещали в камеру с универсальным растворителем состава: бутанол, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода в соотношении 4:1:2, после приближения фронта растворителя к противоположному концу, пластину просушивали и обрабатывали 1% раствором парадиметиламинобензальдегида в 10% растворе соляной кислоты. *Результаты исследования.* Положительный результат - зона желтого окрашивания, характерная для мочевины, появилась на полосе с вытяжкой из пятна на ... (об. ...) и пятном заведомой мочи, взятым для контроля $R_f \approx 0,3$. Отрицательный результат – зоны окрашивания, характерной для мочевины, не наблюдалось.

Установление наличия кала в пятнах. Морфологический метод. Кусочки ткани или вырезки из пятен ... цвета разволокняли на предметных стеклах и готовили 3 препарата: с дистиллированной водой; с раствором Люголя и раствором Судана III. *Результаты исследования:* при микроскопическом исследовании, с использованием микроскопа ... (ок.×, об.×) обнаружено: 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; отрицательный результат – при микроскопическом исследовании ни в одном из изготовленных препаратов элементов, свойственных каловым массам, не обнаружено.

Установление наличия желчи на предмете исследования. Модификация реакции Петтенкоффера. Кусочки ткани ... из пятен зеленовато-коричневатого и зеленоватого цветов (об. ...) экстрагировали в пробирках с помощью физиологического раствора в течение 20 часов в условиях бытового холодильника при температуре +4°C. При этом вытяжки приобрели вид мутной взвеси темно-зеленого цвета без запаха. Далее одну каплю каждой вытяжки, изготовленной из об. ..., помещали на предметное стекло. После подсыхания вытяжек на предметных стеклах, к последним добавляли по одной капле 10% раствора сахарозы и 5 капель концентрированной H₂SO₄. *Результаты исследования:* положительный результат (обнаружение желчи) – появление окрашивания вишневого цвета – наблюдался с вытяжками, изготовленными из об. ...

Установление наличия кишечных протеаз на предмете исследования. Для выявления кишечных протеаз на эмульсионный слой засвеченной, проявленной, отфиксированной и промытой фото пленки помещали кусочки фильтровальной бумаги, пропитанные фосфатным буфером с pH 8,0, на которые наслаивали вытяжки из об. № ... и контрольный образец трипсина в разведении 1:1000. Фото пленку помещали во влажную камеру и в течение 2 час инкубировали при температуре 37°C. Затем фото пленку промывали под струей воды. *Результаты исследования:* в местах внесения контрольного образца трипсина и исследуемых об. ... на черном фоне появились прозрачные зоны, что свидетельствует о наличии кишечных протеаз.

Количественная реакция абсорбции

Установление категории выделительства. Определение антигенов А и В устанавливали в образцах крови и слюны М., в образцах крови и слюны проходящего по делу С. с помощью изосывороток анти-А, анти-В в титре 1:32. Навески из пятен крови и слюны брали по 25 мг, заливали сыворотками по 0,15 мл. Абсорбция протекала при температуре +4°C в течение 20 часов. После

кратного титрования исходных и абсорбированных изосывороток в платах с глубокими лунками, добавления 1% взвеси стандартных эритроцитов групп А_β и В_α, отстаивания в течение 1,5 часов, производили макро- и микроучет. Результат учитывали с помощью микроскопа «...» (ок. 10×, об. 10×). В результате исследования, в образцах крови и слюны М. с сывороткой анти-А получено 6 ступеней поглощения. С сывороткой анти-В ступени поглощения отсутствовали. В образце крови проходящего по делу С. с сывороткой анти-В получено 6 ступеней поглощения, с сывороткой анти-А ступени поглощения отсутствовали. В образце слюны проходящего по делу С. с сывороткой анти-В получено 2 ступени поглощения, с сывороткой анти-А ступени поглощения отсутствовали. Результаты исследования: 1. Кровь М. относится к группе О_{αβ}. М. является выделителем свойственного ей группоспецифического антигена (что установлено исследованием ее слюны). 2. Кровь проходящего по делу С. относится к группе В_α., проходящий по делу С. является невыделителем (слабым выделителем) свойственного ему группоспецифического антигена (что установлено исследованием его слюны).

Определение антигенов АВ0 и Lewis методом дот-ИФА. Выявление антигенов системы АВ0 и Lewis производили в образце слюны проходящей по делу ... и в пятнах слюны на трех окурках сигарет (об. ...). Кусочки из области пятен слюны вырезали, помещали в пробирки и заливали дистиллированной водой с небольшим избытком, вытяжки экстрагировали 20 часов в условиях холодильника. По истечении указанного времени вытяжки центрифугировали 15 минут при 1500 об./минуту. Надосадочную часть вытяжек отсасывали, переносили в отдельные пробирки. Осадок оставляли для цитологических реакций. Надосадочную жидкость разводили боратным буфером 1:1 и однократно наносили по 5 мкл на нитроцеллюлозные мембраны. В качестве контроля исследовали высушенные на полосках нитроцеллюлозной мембраны образцы слюны доноров А(II), В(III), 0(I), АВ (IV), относящихся к категории «выделитель» и имеющих фенотип Le (a-b⁺), а также образец слюны донора Le^a, относящегося к категории «невыделитель» и имеющего фенотип Le (a+b⁻). Мембраны помещали в пять лунок 6-луночного планшета (с соответствующими обозначениями цветными карандашами) и заливали по 3 мл раствора соответствующих антител в фосфатно-солевом буферном растворе с 0,3% твином в 20 рабочих разведениях (анти-А, анти-В, анти-Н,

анти Le a и анти Le b мноклональных антител, меченных пероксидазой хрена). Абсорбция при комнатной температуре 30 минут. После удаления сыворотки, мембраны промывали 2 раза по 10 минут в фосфатно-солевом буфере с 0,3% твином 20 и 1 раз в течение 10 минут в фосфатно-солевом буфере без твина 20. Затем мембраны проявляли в субстратном растворе 4-хлор-1 нафтол в течение 30 минут и отмывали дистиллированной водой в течение 20 минут. Результаты учитывали визуально по выявлению темно-синего осадка, образующегося в зонах локализации ферментативной активности (что свидетельствует о наличии в исследуемом образце соответствующего антигена) и сопоставлению их с контрольными образцами. Результаты исследования приведены в таблице 9.

Таблица 9

Результаты определения групповой принадлежности и категории выделительства

Объекты исследования	Наличие ферментативной активности (темно-синее пятно)					Группа крови, категория выделительства																																
	анти-А	анти-В	Анти-Н	Le ^a	Le ^b																																	
Образец слюны ...	—	+	+	—	+	В(Ш), «выделитель»																																
<u>Окурок № 1</u> Пятно слюны об. ...	—	—	+	—	+	0(І), «выделитель»																																
<u>Окурок № 2</u> Пятно слюны об. ...	+	—	+	—	+	А(ІІ), «выделитель»																																
<u>Окурок № 3</u> Пятно слюны об. ...	+	+	+	—	+	АВ(ІV), «выделитель»																																
<u>Окурок № 4</u> Пятно слюны об. ...	-	-	-	+	—	«невыделитель»																																
	<table border="1"> <tr><td>А</td><td>В</td><td>Н</td><td>АВ</td></tr> <tr><td>+</td><td>-</td><td>-</td><td>+</td></tr> </table>	А	В	Н	АВ	+	-	-	+	<table border="1"> <tr><td>А</td><td>В</td><td>Н</td><td>АВ</td></tr> <tr><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td></tr> </table>	А	В	Н	АВ	-	+	-	+	<table border="1"> <tr><td>А</td><td>В</td><td>Н</td><td>АВ</td></tr> <tr><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td></tr> </table>	А	В	Н	АВ	-	+	-	+	Le ^a +	<table border="1"> <tr><td>А</td><td>В</td><td>Н</td><td>АВ</td></tr> <tr><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td></tr> </table>	А	В	Н	АВ	-	+	-	+	Реакция с контрольными образцами
А	В	Н	АВ																																			
+	-	-	+																																			
А	В	Н	АВ																																			
-	+	-	+																																			
А	В	Н	АВ																																			
-	+	-	+																																			
А	В	Н	АВ																																			
-	+	-	+																																			

Установление видовой принадлежности мышечной и костной ткани

Метод встречного иммуноэлектрофореза в агаре. Исследовали вытяжки, приготовленные из кусочков/опилок костной ткани и фрагментов мышцы. Использовали сыворотки, преципитирующие белок крови человека, рогатого скота и птицы, проверенные в отношении активности и специфичности в этой реакции. Параметры опыта: сила тока 20 мА, напряжение – около 300 V, время – 25 минут. *Результаты исследования:* положительный результат (выпадение преципитатов в виде полос на границе взаимодействия исследуемых объектов и сывороток) наблюдали при взаимодействии вытяжек с сывороткой, преципитирующей белок крови человека, с остальными сыворотками реакция отрицательная, все контроли работали соответствующим образом.

Определение групповой принадлежности мышечной ткани по системе АВ0

Количественная реакция абсорбции. Выявление антигенов А и В производили во фрагментах мышечной ткани трупа с использованием сывороток альфа и бета с титром 1:32, проверенных в отношении специфичности. Соотношение исследуемого материала и сывороток: 25 мг и 0,15 мл. Абсорбция в холодильнике в течение 20 часов, титрование абсорбированных сывороток – в пробирках в кратных разведениях с 1% взвесью стандартных эритроцитов групп А_β, В_α и 0_{αβ}, с последующим центрифугированием 4 минуты при 1500 об./минуту, и микроскопическим учетом результатов с помощью микроскопа «...» (ок. 10×, об. 10×). Результаты исследования приведены в таблице 10.

Метод абсорбции-элюции. Обнаружение антигенов системы АВ0 производили в отпечатке мышечной ткани трупа на марле (не отмытом и отмытом в физиологическом растворе хлорида натрия), в отпечатке мышечной ткани трупа на марле отмытом в хлороформе. В качестве контролей исследовались образцы крови групп А_β, В_α, 0_{αβ}. Ниточки марли из пятен крови и из отпечатка мышечной ткани, длиной до 10 мм, погружали в этиловый спирт на 20 минут для фиксации. Затем материал высушивали при комнатной температуре. Ниточки марли из отпечатка мышечной ткани, отмытом в хлороформе, не фиксировали. В пробирках к ниточкам (с соответствующими обозначениями цветными карандашами) добавляли по несколько капель (с избытком) стандартных изосывороток альфа серии ... и бета серии ... с титром

1:128, моноклональной сыворотки анти-Н серии ... с титром 1:32, проверенных в отношении специфичности. Абсорбция в холодильнике при температуре +4°C в течение 20 часов, с последующей постановкой пробы на истощаемость сывороток (к капле абсорбированной сыворотки добавляли по 1 капле 1% взвеси соответствующих стандартных эритроцитов с последующим центрифугированием и макро- и микроскопическим учетом результатов). После удаления сыворотки материал промывали ледяным физиологическим раствором; к отмытому материалу на предметные стекла (с соответствующими обозначениями цветными карандашами) добавляли 2 капли 0,25% взвеси эритроцитов групп А β , В α и О $\alpha\beta$; помещали во влажные камеры в термостат на 20 минут при температуре +56°C для элюции. Затем препараты выдерживались в тех же влажных камерах 2 часа при комнатной температуре. Учет результата с помощью микроскопа «...» (ок. 10 \times , об. 10 \times) на предметных стеклах под покровными стеклами. Результаты исследования приведены в таблице 10.

Таблица 10

Определение групповой принадлежности мышечной ткани

Объекты исследования	КРА		проба на истощаемость		РАЭ					Выявлены антигены	
	изосыворотки				изосыворотки						
	α	β	α	β	α	β	α	β	а-Н		
Контроль марли	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Образец крови гр. А β	4	-	+	+	+	-	+	-	+	А, Н	
Образец крови гр. В α	-	3	+	+	-	+	-	+	+	В, Н	
Образец крови гр. О $\alpha\beta$	-	-	+	+	-	-	-	-	+	Н	
Фрагменты мышечной ткани трупа ...	-	4	+	+						В, Н	
Отпечаток мышечной ткани трупа ..., на марле, отмытый в физ. растворе			+	+	-	+	-	+	+	В, Н	
Отпечаток мышечной ткани трупа ... не отмытый			+	+	-	+	-	+	+	В, Н	
Отпечаток мышечной ткани трупа ..., на марле отмытый в хлороформе			+	+	-	+	-	+	+	В, Н	

Примечание: знак «+» – обозначает наличие агглютинации эритроцитов, знак «-» – обозначает отсутствие агглютинации эритроцитов, цифры обозначают степень поглощения агглютининов сыворотки.

После исследования кусочки мышечной ткани, отпечаток мышечной ткани на марле трупа ..., переданы в архив отделения. *Результаты исследования:* при определении групповой принадлежности образца мышечной ткани трупа ..., выявлены антигены В и Н, что свойственно человеку с группой крови В_а, с сопутствующим антигеном Н.

Определение групповой принадлежности ногтевой пластины РАЭ

Обнаружение антигенов производилось во фрагментах ногтевой пластины трупа. В качестве контролей исследовались образцы ногтей групп А_β, В_α, О_{αβ}. Фрагменты ногтевой пластины предварительно выдерживали в дистиллированной воде 3 суток, высушивали при комнатной температуре, разделяли на мелкие кусочки, фиксировали кипячением 15 минут, высушивали при комнатной температуре, помещали в пробирки с крышками, с небольшим избытком заливали изогемагглютинирующими сыворотками анти-А (альфа) серия №№ ..., анти-В (бета) серия №№ ... в титре 1:64, моноклональной анти-Н серия № ... в титре 1:32 в кратном разведении, проверенных в отношении специфичности и титра (активности). Абсорбция – 48 часов в условиях холодильника, отмывание от несвязанных антител производили 3 раза охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия путем центрифугирования в течение 1 минуты, элюция – в 2% раствор глицина на 0,5% растворе стандартной сыворотки АВ, в условиях термостата при температуре + 55°С – 30 минут, элюаты переносили в чистые пробирки, к ним добавляли по 1 капле стандартных эритроцитов групп А_β, В_α, О_{αβ}, с последующей экспозицией в течение 30 минут в условиях холодильника. Результаты учитывали микроскопически по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов после центрифугирования пробирок в течение 4 минут при 1500 об./минуту и встряхивания. Учет результата с помощью микроскопа «...» (ок. 10×, об. 10×). Результаты исследования приведены в таблице 11.

Определение группы ногтевой пластины

Объекты исследования	РАЭ с глицином					Выявлены антигены
	α	β	α	β	анти-Н	
Ногти гр. А β	+	-	+	-	+	А, Н
Ногти гр. В α	-	+	-	+	+	В, Н
Ногти гр. О $\alpha\beta$	-	-	-	-	+	Н
Фрагменты ногтевой пластины трупа	+	-	+	-	+	А,Н

Примечание: знак «+» – обозначает наличие агглютинации эритроцитов, знак «-» – обозначает отсутствие агглютинации эритроцитов.

После исследования образец ногтевой пластины трупа ... передан в архив отделения. *Результаты исследования:* При определении групповой принадлежности образца ногтевой пластины трупа ..., выявлены антигены А и Н, что свойственно человеку с группой крови А β , с сопутствующим антигеном Н.

Определение групповой принадлежности костной ткани РАЭ

Определение групповой принадлежности фрагмента поясничного позвонка методом абсорбции-элюции по системе АВ0. Обнаружение антигенов производилось во фрагментах поясничного позвонка от скелетированных останков («Заключение эксперта» № ...). В качестве контролей исследовались образцы ногтей групп А β , В α , О $\alpha\beta$. Фрагменты поясничного позвонка предварительно выдерживали в дистиллированной воде 3 суток, высушивали при комнатной температуре, разделяли на мелкие кусочки, фиксировали кипячением 15 минут, высушивали при комнатной температуре, помещали в пробирки с крышками, с небольшим избытком заливали изогемагглютинирующих сывороток анти-А (альфа) серия №№ ..., анти-В (бета) серия №№ ... в титре 1:128, моноклональной анти-Н серия №... в титре 1:32, проверенными в отношении специфичности и титра. Абсорбция – 48 часов в условиях холодильника, отмывание от несвязанных антител производили 3 раза охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия путем центрифугирования в течение 1 мин, элюция – в 2% раствор глицина на 0,5% растворе стандартной сыворотки АВ, в условиях термостата при

температуре + 56° С – 30 минут, элюаты переносили в чистые пробирки, к ним добавляли по 1 капле стандартных эритроцитов групп А β , В α , О $\alpha\beta$, с последующей экспозицией в течение 30 минут в условиях холодильника. Результаты учитывали микроскопически по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов после центрифугирования пробирок в течение 4 мин при 1500 об./минуту и встряхивания. Учет результата с помощью микроскопа «...» (ок. 10 \times , об. 10 \times). Результаты исследования приведены в таблице 12.

Таблица 12

Определение групповой принадлежности костной ткани

Объекты исследования	РАЭ с глицином					Выявлены антигены
	α	β	α	β	а-Н	
Образец (ногти) гр. А β	+	-	+	-	+	А, Н
Образец (ногти) гр. В α	-	+	-	+	+	В, Н
Образец (ногти) гр. О $\alpha\beta$	-	-	-	-	+	Н
Фрагмент кост. ткани трупа №...	+	-	+	-	+	А, Н
Фрагмент кост. ткани трупа №...	+	-	+	-	+	А, Н

Примечание: знак «+» – обозначает наличие агглютинации эритроцитов, знак «-» – обозначает отсутствие агглютинации эритроцитов.

После исследования фрагменты поясничного позвонка от скелетированных останков («Заключение эксперта» № ...), переданы в архив отделения. *Результаты исследования:* при определении групповой принадлежности фрагмента поясничного позвонка от скелетированных останков («Заклучение эксперта» № ...), выявлены антигены А и Н, что свойственно человеку с группой крови А β , с сопутствующим антигеном Н.

Определение групповой принадлежности зубов РАЭ

Обнаружение антигенов производилось во фрагментах двух зубов трупа. В качестве контролей исследовались образцы ногтей групп А β , В α , О $\alpha\beta$. Фрагменты зубов предварительно выдерживали в дистиллированной воде 2 суток, высушивали при комнатной температуре, разделяли на мелкие кусочки, фиксировали кипячением 15 минут, высушивали при комнатной температуре, помещали в пробирки с крышками, с небольшим избытком заливали изогемоагглютинирующими сыворотками альфа серии 32,30 и бета серии

33,31 с титром 1:128, моноклональной сыворотки анти-Н серии 31-2, с титром 1:64, проверенными в отношении специфичности и титра. Абсорбция – 48 часов в условиях холодильника, отмывание от несвязанных антител производили 3 раза охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия путем центрифугирования в течение 1 минуты, элюция – в 2% раствор глицина на 0,5% растворе стандартной сыворотки АВ, в условиях термостата при температуре + 55°C – 30 минут, элюаты переносили в чистые пробирки, к ним добавляли по 1 капле стандартных эритроцитов групп крови А β , В α , О $\alpha\beta$, с последующей экспозицией в течение 30 минут в условиях холодильника. Результаты учитывали микроскопически по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов после центрифугирования пробирок в течение 4 мин при 1500 об./минуту и встряхивания. Учет реакции с помощью микроскопа «...» (ок. 10 \times , об. 10 \times). Результаты исследования приведены в таблице 13.

Таблица 13

Определение групповой принадлежности зубов

Объекты исследования	РАЭ с глицином					Выявлены антигены
	α	β	α	β	анти-Н	
Ногти гр. А β	+	-	+	-	+	А,Н
Ногти гр.В α	-	+	-	+	+	В,Н
Ногти гр.О $\alpha\beta$	-	-	-	-	+	Н
Мелкоизмельченные кусочки зуба № 1	-	+	-	+	+	В, Н
Мелкоизмельченные кусочки зуба № 2	-	+	-	+	+	В, Н

Примечание: знак «+» – обозначает наличие агглютинации эритроцитов, знак «-» – обозначает отсутствие агглютинации эритроцитов.

После исследования, фрагменты двух зубов трупа переданы в архив отделения. *Результаты исследования:* при определении групповой принадлежности двух зубов неопознанного трупа женщины № ..., на вид 70-75 лет («Заключение эксперта» № ...), выявлены антигены В и Н, что свойственно человеку с группой крови В α , с сопутствующим антигеном Н.

Экспертиза волос

Пример исследовательской части по результатам морфологического исследования волос

Первоначально все представленные на исследование волосы изучили макроскопически и с помощью лупы. Все объекты предварительно промывали в мыльной теплой, а затем в дистиллированной воде. Исследование проводили микроскопически на микроскопе «...» вначале без добавления каких-либо веществ, затем волосы изучали просветленными с помощью смеси глицерина со спиртом в соотношении 1:1, измерение длины проводили с помощью обычной линейки, толщины – с помощью винтового окуляр-микрометра. Рисунок кутикулы изучали в нативных препаратах при опущенном конденсоре в тонком слое просветляющей жидкости.

Волосы по цвету темно-коричневые, по форме – прямые, длиной от 3,5 см до 4,5 см, максимальной толщиной от 0,047 мм до 0,114 мм, средняя максимальная толщина их 0,088 мм.

Оптический край волос мелкозубчатый. Зубцы достаточно плотно прилегают к стволу, у нескольких волос в периферических отделах – незначительно отстоят от ствола. Кутикула в корневых отделах волос просматривается в виде неширокого серого тяжа, в средних и периферических отделах – кутикула окрашена в желтовато-рыжеватый цвет. Рисунок кутикулы средней сложности, линии волнистые, значительно извитые.

Корковое вещество занимает всю или большую часть толщины ствола волос. Фон коркового вещества в корневых отделах волос серовато-бежевый, в средних и периферических – яркий рыжевато-коричневый, переходящий в периферических отделах некоторых волос в красновато-черный (структура волос при этом неразличима), прослеживается граница перехода от одного оттенка к другому (граница нанесения красителя). В корневых отделах имеется значительное количество трещин и пустот. Пигмент присутствует в умеренном количестве. Зерна пигмента крупные, темно-коричневого цвета, группируются в цепочки, узкие штрихи и небольшие мазки. Встречаются единичные небольшие по величине овальные пигментофоры темно-коричневого цвета. На интенсивно окрашенных участках нескольких волос в средних, периферических отделах зерна не просматриваются, либо контуры зерен пигмента видны нечетко. По длине волос наибольшее количество

пигмента расположено в средних отделах. По ширине ствола распределение пигмента равномерное.

Сердцевина отсутствует в 2-х волосах, в остальных представлена единичными островками в корневых, средних отделах, составляет около 1/7-1-9 толщины ствола, бесструктурная, неравномерна по толщине.

Корневые концы волос представлены удлиненными луковичками, три из них – загнуты в виде крючка, у одной луковички нижняя часть имеет зубчатый конец, еще у одной – расщеплена. На двух луковичках влагалищные оболочки не просматриваются, на остальных – имеется крайне незначительное количество влагалищных оболочек.

Периферические концы волос имеют поперечную или косую поверхность сечения, у трех волос – несколько истончены, незначительно расщеплены в виде метелки, у двух – поверхность почти ровная, зашлифованная.

Пример исследовательской части по результатам установления групповой принадлежности волос

Групповую принадлежность волос, изъятых из ванны, устанавливали реакцией абсорбции-элюции с изогемагглютинирующими сыворотками анти-А, анти-В и моноклональной сыворотки анти-Н в титре 1:128. Исследуемые волосы, а также заведомые образцы, предварительно мыли в теплой воде с мылом, прополаскивали в дистиллированной воде, раздавливали с помощью специального приспособления и по 3 кусочка длиной 0,8 см вводили в реакцию. Абсорбция протекала в течение 20 часов в условиях бытового холодильника. После отмывания неабсорбированных антител охлажденным физиологическим раствором, проводили элюцию абсорбированных антител в 0,1% взвесь стандартных тест-эритроцитов групп А_β, В_α и О_{αβ} на сыворотке группы АВ (1:66) при температуре +48°С в течение 30 минут, на стеклах во влажных камерах. Учет результатов реакции микроскопический, в течение 2 часовой экспозиции при комнатной температуре. В результате реакции отмечали агглютинацию тест-эритроцитов групп А_β, В_α, О_{αβ}. Все контроли работали соответствующим образом.

Примеры исследовательской части по результатам сравнительного исследования волос

1. Пример написания сравнительного исследования сходных волос

Волосы, изъятые из ванны, сравнивали между собой и с волосами-образцами с головы А. ... – по описанию и в одном поле зрения микроскопа. В результате сравнительного исследования, установлено, что волосы, изъятые из ванны, не обнаружили резких признаков различия между собой и обнаружили признаки сходства с волосами образцами с головы Н. ... по основным морфологическим характеристикам: по цвету, форме, длине, максимальной толщине, по внешнему виду кутикулы, по оттенку коркового вещества, по цвету и размерами зерен пигмента, характера его скоплений, виду периферических концов, по наличию в подавляющем большинстве волос признаков окрашивания красителем. Кроме того, сходными оказались и антигенная характеристика волос, изъятых из ванны и волос-образцов с головы Н. ... – в них выявлены антигены А, В и Н.

2. Пример написания сравнительного исследования несходных волос.

Волосы, изъятые из ванны, сравнивали между собой и с волосами-образцами с головы Б. ... – по описанию и в одном поле зрения микроскопа. В результате сравнительного исследования обнаружены резкие различия: максимальная длина волос, изъятых из ванны – 4,5 см, а длина большинства волос-образцов – 15,0-21,0. Волосы-улики по форме – прямые, а образцы волос – волнистые. Волосы-улики содержат умеренное количество крупно-зернистого пигмента темно-коричневого цвета, образующего скопления, а в волосах-образцах пигмент – пылевидный, коричневато-серый, без выраженных скоплений; кроме того, в волосах-уликах встречаются пигментофоры, а в волосах-образцах они отсутствуют.

Установление половой принадлежности волос

Корневые концы волос заливали 25% раствором уксусной кислоты и экстрагировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Препараты готовили в соответствии с методическим руководством Науменко В.Г. и Митяевой Н.А. «Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине». Готовые мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали 15 минут этанолом и окрашивали раствором пропилакрихиниприта. Затем подвергали микроскопии на микроскопе «...» объектив водной иммерсии 60^x окуляр 10^x в люминесцентном режиме. При этом в препаратах найдены светящиеся зеленоватым светом клетки наружного

корневого влагалища волоса, залегающие небольшими группами и в виде обширных пластов с пригодными для диагностики ядрами (ядра с четкими контурами, неповрежденными оболочками и плотной хроматиновой субстанцией). При этом, ярко флюоресцирующие глыбки У-хроматина были обнаружены в 3 из 5 клеточных ядер клеток наружного корневого влагалища волоса в каждом препарате (об. №№...), что свидетельствует о происхождении клеток от лица мужского генетического пола. После обесцвечивания и фиксации этанолом препараты окрашивали 0,1% раствором азур-эозиновой смеси, после чего подвергали микроскопии на том микроскопе, при тех же параметрах, но в световом режиме. При этом телец Барра в ядрах клеток наружного корневого влагалища волоса не обнаружено. *Результаты исследования:* волосы, присланные на исследование, принадлежат мужчине.

Установление половой принадлежности крови (вариант 1)

Осадки (после установления наличия крови) либо вырезки (смывы) с вещественных доказательств заливали 25% раствором уксусной кислоты и экстрагировали в течение 24 часов при комнатной температуре. Препараты готовили в соответствии с методическим руководством Науменко В.Г. и Митяевой Н.А. «Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине». Готовые мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали 15 минут этанолом и окрашивали раствором пропилакрихиниприта. Затем подвергали микроскопии на люминесцентном микроскопе «...» (объектив водной иммерсии 60^x окуляр 10^x). При этом, во всех препаратах найдены клетки круглой и полигональной формы без ядер, микробная флора, бесструктурные массы. В препаратах из об. №№ ... на фоне вышеуказанного найдены светящиеся зеленоватым светом лейкоциты крови с пригодными для диагностики ядрами (ядра с четкими контурами, неповрежденными оболочками и плотной хроматиновой субстанцией). При этом в 3 из 6 (об. №№...) и в 4 из 9 (об. №№...) лейкоцитов найдены хорошо выраженные единичные ярко флюоресцирующие глыбки круглой, либо серповидной формы (У-хроматин), что указывает на происхождение клеток от лица мужского генетического пола. Ни в одном из 30 ядер гранулоцитов, в каждом препарате, полоспецифических женских отростков типа А и В не обнаружено. *Результаты исследования:* на вещественных доказательствах установлена кровь мужского генетического пола.

Установление половой принадлежности крови (вариант 2)

Осадки (после установления наличия крови), либо вырезки и смывы с вещественных доказательств заливали 25% раствором уксусной кислоты и экстрагировали в течение 24 часов при комнатной температуре. Препараты готовили в соответствии с методическим руководством Науменко В.Г. и Митяевой Н.А. «Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине». Готовые мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали 15 минут этанолом и окрашивали раствором пропилакрихиниприта. Затем подвергали микроскопии на микроскопе «...», объектив водной иммерсии 60^x, окуляр 10^x в люминесцентном режиме. При этом во всех препаратах найдены клетки круглой и полигональной формы без ядер, микробная флора, бесструктурные массы. В препаратах из об. №№ ... на фоне вышеуказанного найдены светящиеся зеленоватым светом лейкоциты крови, залегающие изолированно и небольшими группами (по 2-3 клетки), с пригодными для диагностики ядрами (ядра с четкими контурами, неповрежденными оболочками и плотной хроматиновой субстанцией). При этом ни в одном из 30 ядер лейкоцитов в каждом препарате, где они найдены, ярко флюоресцирующие глыбки Y-хроматина не обнаружены. После обесцвечивания и фиксации этанолом препараты окрашивали 0,1% раствором азур-эозиновой смеси, после чего подвергали микроскопии на том микроскопе, при тех же параметрах, но в световом режиме. При этом в 3 из 8 (об. № ...) и в 4 из 11 (об. №№ ...) обнаруженных в исследуемых препаратах ядер гранулоцитов найдены женские полоспецифические отростки типа А (образования круглой, либо каплевидной формы, прикрепленные к сегменту длинной хроматиновой нитью) и В (образования круглой, либо каплевидной формы, прикрепленные к сегменту короткой хроматиновой нитью, либо без нее), что указывает на происхождение клеток от лица женского генетического пола. *Результаты исследования:* на вещественных доказательствах установлена кровь женского генетического пола.

Установление наличия эпителиальных клеток

Смывы с полового члена помещали в пробирки, заливали 10% раствором уксусной кислоты и экстрагировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Препараты готовили в соответствии с методическим руководством Науменко В.Г. и Митяевой Н.А. «Гистологический и цитологический методы

исследования в судебной медицине». Готовые мазки высушивали при комнатной температуре и окрашивали 0,05% раствором амидо-черного в жидкости Карнуа. Затем подвергали микроскопии на световом микроскопе «...», объектив 40х, окуляр 10х. При этом во всех препаратах найдены клетки округлой и полигональной формы без ядер, микробная флора, бесструктурные массы. В препаратах из мазка с полового члена обвиняемого (об. №№ ...) найдены эпителиальные клетки с круглыми и овоидными ядрами темно-синего цвета. У некоторых клеток около ядра имеется зона просветления (нимба). Клетки имеют в цитоплазме белковые включения в виде зерен темно-синего цвета, расположенные диффузно. После обесцвечивания препараты окрашивали на гликоген (наносили каплю раствора Люголя), накрывали покровным стеклом и помещали на предметный столик того же микроскопа. При микроскопии в световом режиме, объектив 40^x, окуляр 10^x, гликоген в виде темно-коричневых гранул был найден в большей части клеток многослойного плоского эпителия. После обесцвечивания и фиксации этанолом препараты окрашивали ПАИ и подвергали микроскопии на люминесцентном микроскопе «...», объектив водной иммерсии 60^x, окуляр 10^x. При этом ни в одном из 30 ядер эпителиоцитов, в каждом препарате, где они обнаружены, ярко флюоресцирующих глыбок Y-хроматина не обнаружено. После перекрашивания препаратов 0,1% раствором азури-эозиновой смеси их микроскопировали на том же микроскопе, при тех же параметрах, но в световом режиме. При этом хорошо была различима морфология клеток, которые залегали изолированно, либо небольшими группами по 2-3 клетки. Их цитоплазма образовывала складки, часто была завернута. Был выражен полиморфизм, то есть встречались клетки базального, парабазального, поверхностного и промежуточного слоев многослойного плоского эпителия. В 3 из 4 ядер эпителиоцитов были обнаружены тельца Барра (X-хроматин) – образования серповидной, треугольной, либо трапециевидной формы темнее основного фона ядра и залегающие возле самой мембраны, что указывает на происхождение клеток от лица женского генетического пола. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что обнаруженные при исследовании клетки происходят из влагалища женщины. *Результаты исследования:* на смыве с полового члена обнаружены клетки вагинального (влагалищного) эпителия.

Установление наличия клеток поперечно-полосатой мускулатуры на орудии травмы и их половой принадлежности

Кусочки ткани биологического происхождения, изъятых с ножа, измельчали, помещали в пробирки, заливали 25% раствором уксусной кислоты и экстрагировали в течение 48 часов при комнатной температуре. Препараты готовили в соответствии с методическим руководством Науменко В.Г. и Митяевой Н.А.: «Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине» – М. 1980 г. Готовые мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали 15 минут этанолом и окрашивали раствором пропилакрихиниприта. Затем подвергали микроскопии на люминесцентном микроскопе «...» (объектив водной иммерсии 60^x, окуляр 10^x). При этом в препаратах из об. №... (например, 10) на фоне большого количества микрофлоры, бесструктурных масс и клеток округлой и полигональной формы без ядер найдены удлиненные образования с заметной поперечной исчерченностью толщиной около 10 мкм зеленоватого цвета с светящимися ярко зеленым цветом пригодными для диагностики ядрами (ядра с четкими контурами, неповрежденными оболочками и плотной хроматиновой субстанцией). Ни в одном из 30 ядер ярко флюоресцирующие глыбки Y-хроматина не были найдены. После обесцвечивания и фиксации этанолом препараты окрашивали 0,1% раствором азур-эозиновой смеси и подвергали микроскопии на том же микроскопе, при тех же параметрах, но в световом режиме. При этом можно было различить структуру симпласта с темно-фиолетовыми ядрами в виде овалов и палочек размерами около 19-20 мкм. Поперечная исчерченность просматривалась достаточно хорошо. Сам фон симпласта от светло-голубого до голубого цвета. В 3 из 4 ядер клеток найдены тельца Барра (X-хроматин): образования серповидной, треугольной, трапециевидной формы, выделяющиеся более темной окраской на фоне ядра и лежащие около мембраны), что указывает на происхождение клеток от лица женского генетического пола. *Результаты исследования:* на присланном на исследование ноже найдены клетки поперечнополосатой мускулатуры женского генетического пола.

13. ОФОРМЛЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ЭКСПЕРТА

Судебно-биологическую экспертизу оформляют Заключением эксперта, имеющим порядковый номер в соответствии с регистрацией в журнале.

Если биологические объекты от трупа, живого лица или поступившие с материалами дела направляются на исследование в иные структурные подразделения СЭО, результаты их исследования оформляются в трех экземплярах. Один экземпляр остается в архиве структурного подразделения СЭО, а два экземпляра направляются эксперту для приобщения к первому и второму экземплярам заключения эксперта.

Первый титульный лист Заключения эксперта оформляют с реквизитами СЭО, в которой проводится экспертиза. Далее в определенном порядке следуют поставленные вопросы, «Обстоятельства дела», «Описание вещественных доказательств», «Исследование», «Выводы».

В разделе «Обстоятельства дела» кратко излагают суть дела, указанную в постановлении (определении). При повторных экспертизах в этот раздел включают выводы первичного заключения с обязательным указанием СЭО, где эту экспертизу проводили, фамилию эксперта, ее исполнившего, а также номер заключения и дату ее проведения.

Осмотр и описание вещественных доказательств должны производиться с указанием полной характеристики следов биологического происхождения. При этом должен соблюдаться основной принцип, позволяющий в последующем на любом этапе следствия или суда опознать эти предметы, т.е. подробно указывают фактуру, основные размеры, отличительные детали, цвет, изношенность, повреждения, загрязнения и др. Особые требования предъявляют к описанию следов биологического происхождения: в обязательном порядке отмечают локализацию следа, его цвет, форму, контуры, степень пропитывания, уплотнение, размеры, особенности. Следы, подвергавшиеся уничтожению, описывают с особой тщательностью, предусматривая подпарывание швов, разбор орудий (оружия) преступления и т.д. В случае необходимости целесообразно использовать специальные бланки

со схематическим изображением одежды, обуви, орудий и т.д., по возможности фотографировать вещественные доказательства.

Эксперт обязан подробно описать образцы, представленные для сравнения вместе с вещественными доказательствами, а также образцы, взятые в отделении в присутствии следователя или иного сотрудника следственной бригады.

В исследовательской части Заключения последовательно излагают ход примененных методов и реакций. Результаты, получаемые при проведении исследований, могут излагаться либо в специальных таблицах, либо в повествовательной форме.

В разделе «Выводы» вначале излагают данные по групповой характеристике (в необходимых случаях – по категории выделительства) лиц, образцы крови и выделений которых представлены для сравнительного изучения; затем следует перечисление результатов исследования объектов экспертизы, затем формулируют общий вывод о возможности (невозможности) происхождения подвергшихся исследованию объектов от конкретного человека, интересующего следствие или суд. Выводы должны быть достаточно краткими, научно обоснованными и изложенными в доступной для восприятия форме. Подобный принцип должен соблюдаться при проведении всех видов судебно-биологических экспертиз.

В заключении эксперта должны быть отражены:

дата, время и место проведения экспертизы;

основания для выполнения экспертизы;

орган или лицо, назначившее экспертизу;

сведения о судебно-экспертной организации и эксперте (фамилия, имя, отчество (при наличии), образование, специальность, стаж работы, ученая степень и ученое звание, должность);

сведения о предупреждении эксперта об уголовной ответственности за дачу заведомо ложного заключения;

вопросы, поставленные перед экспертом или комиссией экспертов;

перечень предметов (объектов), представленных для проведения экспертизы;

сведения об участниках процесса, присутствовавших при проведении экспертизы;

содержание и результаты всех этапов экспертных исследований с указанием примененных медицинских и иных технологий, экспертных методик, технических средств и материалов;

выводы по поставленным перед экспертом вопросам;

перечень объектов, изъятых для дальнейших экспертных исследований в судебно-экспертной организации или переданных органу или лицу, назначившему экспертизу;

условия, методики и результаты получения образцов для сравнительного исследования;

сведения о применении разрушающих объекты методов исследования и израсходованных или уничтоженных объектах экспертизы;

технические характеристики использованного оснащения (для средств цифровой фотографии – вид, модель, производитель; вид, наименование, версия программного обеспечения для обработки растровых и видеоизображений).

Материалы, иллюстрирующие заключение эксперта (при их наличии), прилагаются к заключению и служат его составной частью.

Оформленное Заключение эксперта вместе с надлежаще упакованными вещественными доказательствами и сопроводительным документом передают для отправки в канцелярию СЭО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование системы экспертизы вещественных доказательств, возникновение и совершенствование доказательных методов исследования биологических объектов в нашей стране происходило постепенно, с середины XIX века. Пик ее развития пришелся на вторую половину XX века, когда появилось новое направление – судебная цитология, в практику работы судебно-биологических отделений были введены современные варианты иммунологических реакций и электрофоретических методик.

Со второй половины 1990-х годов, традиционные (физико-химические, иммунологические, морфологические) методы исследования вещественных доказательств, перестали в нашей стране совершенствоваться такими стремительными темпами, как в предыдущие десятилетия, стал ощущаться недостаток в новых научных разработках и, в то же время, началось активное внедрение в экспертную практику молекулярно-генетических методов, обладающих большей доказательностью. Это явилось причиной возникновения проблемы целесообразности применения судебно-биологических методов исследования при производстве экспертиз вещественных доказательств биологического происхождения, необходимости дальнейшего развития научных исследований в области судебной биологии и существования судебной биологии как самостоятельного раздела судебной медицины.

Однако, в 2000-е годы, благодаря появлению новых медицинских технологий, а именно новых и усовершенствованных видов иммунологических методов, таких как дот-ИФА, количественного твердофазного ИФА, дальнейшего совершенствования судебно-цитологических методов, прорыв в области судебно-биологической экспертизы, заключающийся, прежде всего, в большей точности и объективизации результатов экспертных исследований, все же произошел.

В настоящее время перед экспертами отделений судебно-биологической и судебно-цитологической экспертизы СЭО стоит задача по расширению арсенала применяемых методов за счет внедрения новых медицинских технологий и переходу на новый качественный уровень выполнения экспертных исследований, предполагающий комплексный подход к исследованию вещественных доказательств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова В.Ю. Иммунологические методики в комплексном анализе микрообъектов судебно-биологической экспертизы: автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.Ю. Александрова. – М., 2008. – 24 с.
2. Алексеева В.И. Исследование антигенов системы Lewis в пятнах слюны спермы, мочи в судебно-медицинских целях: автореф. дис. ... канд. мед. наук. / В.И. Алексеева. – М., 1978.
3. Антонова С.Н., Любинская С.И. Судебно-медицинская цитология/ В кн. В.Г. Наumenко, Н.А. Митяевой: Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине. – М.: Медицина, 1980. – С.226-296.
4. Антонова С.Н., Любинская С.И. Судебно-цитологическая диагностика половой принадлежности слюны и волос по Х-хроматину/Методические указания. М., 1975.
5. Барсегянц Л.О. Морфологические особенности волос человека в аспекте судебно-медицинской экспертизы. – М., 1992. – 214 с.
6. Барсегянц Л.О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств (кровь, выделения, волосы). – М., 2005. – 447 с.
7. Барсегянц Л.О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств (кровь, выделения, волосы). – М., 1999. – 272 с.
8. Барсегянц Л.О. Судебно-медицинская экспертиза выделений организма. – М., 1998. – 144 с.
9. Бронникова М.А. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств). – М., 1947. – 205 с.
10. Бронникова М.А., Кисина М.В., Стегнова Т.В. Особенности судебно-биологической экспертизы следов малой величины. М., ВНИИ МВД СССР. 1982. – 80 с.
11. Гальцева Е.Е. Выявление антигена D система резус в пятнах крови реакцией абсорбции-элюции в судебно-медицинских целях: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.Е. Гальцева. – М., 1974.

12. Гусаров А.А. Динамика основных показателей экспертной деятельности судебно-биологических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы Российской Федерации с 1980 по 2008 гг. // Судебно-медицинская экспертиза. 2010;53(2):32–34.

13. Гусаров А.А. Основные итоги экспертной работы судебно-биологических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы Российской Федерации, выполненной в 2009 г. // Судебно-медицинская экспертиза. 2011;54(5):34–36.

14. Гусаров А.А. Формирование научно-методической базы отечественной судебной биологии // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010;53(1): 44–46.

15. Гусаров А.А. Обзор отечественных диссертаций по судебной медицине, посвященных вопросам судебной биологии // Судебно-медицинская экспертиза. – 2009. – Т. 52, – № 5. – С. 40-44.

16. Гусаров А.А. Современное состояние экспертизы вещественных доказательств биологического происхождения в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации и пути ее совершенствования: автореф. дис. ... докт. мед. наук – М., 2012.

17. Гусаров А.А., Сурикова Н.Е. Методика производства судебно-медицинских цитологических исследований по делам о половых преступлениях: учебное пособие. – 2023. – 96 с.

18. Гусаров А.А. Об алгоритмах и методах исследования следов крови, применяемых при производстве судебно-биологических экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации // Медицинская экспертиза и право. – 2011. – № 3. – С. 29–31.

19. Гусаров А.А. Сидоров В.Л., Ягмуров О.Д. Современные экспертные алгоритмы исследования следов крови, спермы и слюны на вещественных доказательствах // Вестник Всероссийского общества специалистов по медико-социальной экспертизе, реабилитации и реабилитационной индустрии. – 2017. № 4. – С. 70–81.

20. Гусаров А.А. Об алгоритмах и методах исследования следов крови, применяемых при производстве судебно-биологических экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации // Медицинская экспертиза и право. – 2011. № 3. – С. 29-31.

21. Гусаров А.А., Шигеев С.В., Фетисов В.А. Анализ тематики и структуры научных публикаций по судебной биологии в журнале «Судебно-медицинская экспертиза» (1960-2010 гг.) // Судебно-медицинская экспертиза.– 2015.– Т. 58, № 5.– С. 57-61.

22. Гусаров А.А. Способ выявления агглютининов в условиях влияния предмета-носителя // В сборнике: Совершенствование судебно-медицинской экспертизы в условиях реформирования Вооруженных Сил Российской Федерации. – 2004. – С. 199–200.

23. Гуртовая С.В. Краткое руководство по составлению экспертных выводов в судебно-биологических экспертизах. – М., 1999. – 32 с.

24. Гуртовая С.В. Унифицированный учет работы экспертов судебно-биологических отделений. – М., 1998. – 6 с.

25. Гуртовая С.В. Сборник методических документов по судебно-биологическим исследованиям вещественных доказательств. – М., 1998. – 157 с.

26. Гуртовая С.В., Курджиева О.Б. Сборник научных статей по судебной биологии. – М., 1999. – 113 с.

27. Загрядская А.П., Володин С.А., Асадчих Н.П., Федоровцев А.Л., Королева Е.И. Применение люминесцентной микроскопии при судебно-медицинском исследовании крови, спермы, клеток, влагалищного эпителия, волос /Методические рекомендации. – Горький, 1982.

28. Загрядская А.П., Ревнитская Л.А., Кольш М.Ш., Федоровцев А.Л. О выявлении на орудиях механической травмы клеточных элементов животного происхождения с установлением видовой, групповой и половой принадлежности клеток/ Об определении группоспецифических антигенов системы АВО в окрашенных гистологических и цитологических препаратах органов и тканей человека/ Методические рекомендации. – М., 1982.

29. Зими́на Ю. В. Определе́ние групповых факторов изосерологической системы АВО в следах крови малой величины реакцией абсорбции-элюции: Учебное пособие для врачей. – СПб.: Издательство СпбМАПО – 2009. – 28 с.
30. Зими́на Ю. В. Определе́ние групповых факторов изосерологической системы АВО в следах крови малой величины реакцией абсорбции-элюции: Учебное пособие для врачей, издание второе, исправленное и дополненное – СПб.: Издательство СпбМАПО – 2012. – 26 с.
31. Зими́на Ю. В. Дифференциальная диагностика волос анатомических областей тела человека по микроморфологическим признакам: Учебное пособие для врачей. – СПб.: Издательство СпбМАПО – 2008. – 28 с
32. Зими́на, Ю. В. Частные вопросы судебно-медицинской экспертизы волос. Часть 1: Учебное пособие для врачей. СпбМАПО – 2011. – 56 с.
33. Зими́на Ю. В., Сулейменова Г.М. Методика определения сходства-различия волос человека в судебно-медицинской практике: Учебное пособие для врачей – СПб. : Издательский дом СпбМАПО – 2002. – 30 с.
34. Ильина, Е.А. Выявление фетального гемоглобина в пятнах крови методом электрофореза в агаровом геле/ Информационное письмо. ФГБУ «РЦСМЭ» Минздравсоцразвития России. – М., 2003.
35. Кисин М.В., Стегнова Т.В. Определе́ние группы крови и волос методом «смешанной» агглютинации. Изд. ВНИИ МВД СССР, 1974. – 20 с.
36. Любинская С.И. Диагностика половой принадлежности слюны и волос. – М., 1973. – 16 с.
37. Любинская С.И., Ковач М., Исследование Y-хроматина в объектах судебно-медицинской экспертизы. – М., 1976. – 28 с.
38. Лелиовская А.А. Видовое определение мышечной и некоторых внутренних органов электромунопреципитации: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.А. Лелиовская. – М., 1974.
39. Методическое письмо. О применении в судебно-медицинской практике реакции преципитации геле. – М., 1963. – 4 с.

40. Методическое письмо об определении групп изосерологической системы АВ0 в волосах. – М., 1968. – 6 с.
41. Методические рекомендации. Об установлении категории выделительства антигенов системы АВ0 по желчи или моче, изъятым из трупа. – М., 1975. – 10 с.
42. Методическое письмо. Определение групп изосерологической системы АВ0 в пятнах крови малой величины методы-абсорбции при помощи изосывороток. – М., 1970. – 8.с.
43. Методические рекомендации. Об определении групп изосерологической системы АВ0 в следах слюны и спермы реакцией абсорбции-элюции с изосыворотками альфа и бета. М., 1970. – 7.с.
44. Методическое письмо. Об определении типов М, N и MN в судебно-медицинской практике. – М, 1957. – с.7.
45. Методическое письмо. Об определении наличия слюны в пятнах. – М., 1961. – 4 с.
46. Методические указания об определении наличия и видовой принадлежности пота. – М.,1976. – 8 с.
47. Методические указания. Судебно-цитологическая диагностика половой принадлежности слюны и волос по X-хроматину. – М, 1975.
48. Методическое письмо. Диагностика половой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах. 1969.
49. Найденова Т.В. Установление давности следов крови на вещественных доказательствах фотоколориметрическим методом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Т.В. Найденова. – М., 2013.
50. Ольховик В.П., Гуртовая С.В. Установление видовой принадлежности крови и некоторых других биологических объектов методом встречного иммуноэлектрофореза на ацетат-целлюлозной пленке/ Методические рекомендации. – М., 1976. – 10 с.

51. Ревнитская Л.А. Определение групповой принадлежности вырванных волос методами абсорбции-элюции и смешанной агглютинации: автореф. дис... канд. мед. наук / Л.А. Ревнитская. – Горький, 1971.

52. Ревнитская Л.А., Федоровцев А.Л. Об изъятии материала и приготовлении цитологических препаратов для выявления клеток влагалищного эпителия на половых органах мужчин/ Информационное письмо. – М., 1998.

53. Ревнитская Л.А., Федоровцев А.Л. Об исследовании безъядерных эпидермальных чешуек в подногтевом содержимом рук/ Информационное письмо. – М., 1998.

54. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25.09.2023 № 491н «Об утверждении Порядка проведения судебно-медицинской экспертизы» (Зарегистрировано в Минюсте России 24.10.2023 № 75708).

55. Сабчук Э.П., Ягмуров О.Д., Гусаров А.А., Сидоров В.Л. Способы применения количественной реакции абсорбции для установления групповой принадлежности следов крови на вещественных доказательствах// Вестник судебной медицины. 2023; 12(1):15-20.

56. Сахаров Р.С., Кондратова И.В. Выявление антигенов системы Rh в следах крови/ Усовершенствованная медицинская технология. – М. 2006. – 11 с.

57. Свирский М.С. Изучение методов абсорбции-элюции и «смешанной агглютинации» в судебно-медицинских целях: автореф. дис... канд. мед. наук / М.С. Свирский. – М., 1969.

58. Сидоров В.Л., Бабаханян Р.В., Заславский Г.И., Маяцкая М.В., Попов В.Л. Судебно-цитологическая экспертиза (назначение, порядок изъятия вещественных доказательств, исследование, документы, оценка)// Библиотека судебно-медицинского эксперта. Выпуск 3. – Спб.: Изд-во НИИХ СПб, 2000. – 48 с.

59. Сидоров В.Л., Заславский Г.И., Маяцкая М.В., Бабаханян Р.В., Попов В.Л. Люминесцентные методы исследования крови и спермы в пятнах

на вещественных доказательствах// Библиотека судебно-медицинского эксперта. Выпуск 4. – Спб.: Изд-во НИИХ СПб, 2000. – 24 с.

60. Сидоров В.Л., Заславский Г.И., Маяцкая М.В., Попов В.Л. Цитологические и люминесцентные методы при судебно-медицинском исследовании вещественных доказательств // СПб, 2003. – 88 с.

61. Сидоров В.Л., Гусаров А.А., Исакова И.В., Ягмуров О.Д. Установление видовой принадлежности биологических объектов по IgG человека с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа / Усовершенствованная медицинская технология. – М., 2011.

62. Сидоров В.Л., Гусаров А.А., Исакова И.В., Черепанова Т.В., Спиридонова О.В., Ягмуров О.Д. Установление наличия спермы на вещественных доказательствах по простатическому специфическому антигену человека с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа / Усовершенствованная медицинская технология. – М., 2011.

63. Сидоров В.Л., Гусаров А.А., Исакова И.В. Установление наличия спермы на вещественных доказательствах по кислой фосфатазе колориметрическим методом / Методические рекомендации. Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздравсоцразвития России. – М., 2012.

64. Сидоров В.Л., Лобан И.Е., Гусаров А.А., Исакова И.В., Хоровская Л.А. Портнова Н.А., Черепанова Т.В. Установление наличия слюны на вещественных доказательствах колориметрическим методом по альфа-амилазе/ Методические рекомендации. Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздравсоцразвития России. – М., 2020.

65. Сидоров В.Л., Лобан И.Е., Гусаров А.А., Исакова И.В., Хоровская Л.А. Портнова Н.А. Алгоритм исследования следов крови и выделений на вещественных доказательствах методами количественного иммуноферментного анализа и колориметрии/ Методические рекомендации.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздравсоцразвития России. – М., 2021.

66. Сидоров В.Л., Лобан И.Е., Гусаров А.А., Портнова Н.А., Хоровская Л.А. Сравнительная характеристика методов исследования вещественных доказательств, применяемых для установления наличия крови и выделений в Российской Федерации и в зарубежных странах // Вестник судебной медицины. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 10–16.

67. Спутьник С.В., Гусаров А.А., Перельман М.В. Способ определения фенотипов гаптоглобина в жидкой крови и в пятнах крови методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле/ Методические рекомендации. Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздравсоцразвития России. – М., 2012.

68. Сулейменова Г.М., Зимина Ю.В. Сочетанное использование иммунологических реакций в экспертизе выделений / Труды Петербургского научного общества судебных медиков. Вып. 1. Под. ред. проф. Мазуренко. 1997; С. 90-93.

69. Сулейменова, Г.М. Идентификация крови на вещественных доказательствах: Экспертная практика и составление выводов при судебно-биологической экспертизе/ Г.М. Сулейменова. – СПб. Гиппократ, 2010. – 232 с.

70. Сулейменова, Г.М. Методика сравнения и оценка диагностической значимости морфологических признаков в судебно-медицинской экспертизе сходства-различия волос человека. – СПб.: Издательство СпбМАПО – 2009. – 39 с.

71. Сулейменова, Г.М. Методика и тактика сравнения, оценка диагностической значимости морфологических признаков судебно-медицинской экспертизе сходства-различия волос человека: учебное пособие для врачей. – СПб.: СпбМАПО. – 2011. – 76 с.

72. Сулейменова, Г.М. Методика и тактика сравнения, оценка диагностической значимости морфологических признаков судебно-

медицинской экспертизе сходства-различия волос человека: учебное пособие для врачей. – Спб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2012. – 52 с.

73. Сулейменова, Г.М. Идентификация следов выделений. Составление выводов при судебно-биологической экспертизе: учебное пособие для врачей. – Издание 2-е, стереотипное. – Спб.: СПбМАПО – 2011. – 76 с.

74. Сулейменова, Г.М. Идентификация следов выделений. Составление выводов при судебно-биологической экспертизе: учебное пособие для врачей. – Спб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2013. – 80 с.

75. Сулейменова, Г.М. Идентификация волос учебное пособие для врачей. – Спб: Фолиант, 2015. – 136.

76. Сулейменова, Г.М. Идентификация волос: Варианты тактики и составление выводов при судебно-медицинской биологической экспертизе сходства-различия волос: Учебное пособие для врачей. – Спб.: Фолиант, 2015. – 136 с.

77. Сулейменова, Г.М. Варианты тактики и методика исследования при судебно-медицинской биологической экспертизе сходства-различия волос: учебное пособие для врачей– Издательство СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2015. – 68 с.

78. Томилин В.В., Гладких А.С. Судебно-медицинское исследование крови. – М.: Медицина, 1981. – 240 с.

79. Томилин В.В., Барсегянц Л.О., Гладких А.С. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. М: Медицина, 1989. – 304 с.

80. Туманов А.К. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. – М., 1961. – 580 с.

81. Туманов А.К. Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. – М.: Медицина, 1975. – 408 с.

82. Туманов А.К, Бронникова С.Г. Установление видовой принадлежности крови и некоторых других биологических объектов методом встречного иммуноэлектрофореза (электропреципитации)/ Методические рекомендации. – М., 1976.

83. Чарный В.И. Установление видовой специфичности белков крови. – М.: Медицина, 128 с.
84. Федоровцев А.Л., Ревнитская Л.А., Королева Е.И., Эделев Н.С. Судебно-медицинские цитологические исследования следов на вещественных доказательствах: Монография. – Нижний Новгород. 2009. – 136 с.
85. Федоровцев А.Л. Определение клеток буккального эпителия при судебно-медицинских цитологических исследованиях // Судебно-медицинская экспертиза. – 1992, № 2, С. 28-30.
86. Федоровцев А.Л. Об изъятии материала и приготовлении цитологических препаратов для выявления клеток влагалищного эпителия на половых органах мужчин/Информационное письмо. – М., 1998.
87. Шалаев Н.Г. Судебно-медицинская экспертиза подозреваемых в половых преступлениях: автореф. дис... д-ра мед. наук. – Горький, 1966.
88. Чистович Ф.Я. Изменения свойств крови при впрыскивании инородной сыворотки крови в связи с теорией иммунитета Эрлиха/ Рус. арх. патол., клин. мед. и бактериологии. 1899. июль, С. 21-23.
89. Четвертнова А.П. Комплексное исследование мекония на вещественных доказательствах: автореферат... дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. – М., 2020.
90. Barni F., Berti A., Rapone C., Lago G. Alpha-amylase kinetic test in bodily single and mixed stains. // J. Forensic Science. 2006; 51(6): 1389-1396.
91. Cattaneo C., DiMartino S., Scali S., Craig O.E., Grandi M., Sokol R.J. Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques // Forensic Sci Int. – 1999. – Vol. 102, № 2-3. P. 181-191.
92. Evers H., Heidom F., Gruber C., Lasczkowski G., Risse M., Dettmeyer R., Verhoff M.A. Investigative strategy for the forensic detection of sperm traces // Forensic Sci. Med. Pathol. – 2009. – Vol. 5, № 3. P. 182-188.

93. Fletcher S.M., Dolton P., Harris-Smith P.W. Species identification of blood and saliva stains by enzyme-linked immunoassay (ELISA) using monoclonal antibody // *J. Forensic Sci.* – 1984. – Vol. 29, № 1. – P. 67-74.

94. Gorzkiewicz M., Woimiak M., Grzybowski T., Juczak S., Linkowska K., Daca P. Identification of semen in bloodstains with the use of alternative light source and biochemical screening tests // *Arch. Med. Sadowej Kryminol.* – 2008. – Vol. 58, № 4. – P. 182-187.

95. Hafkensheid, J.C. Results by the Phadebas amylase test for human sera in the presence and absence of albumin // *Clin. Cheme.* 1978. – Vol. 24. – №11. – P. 2061-2062.

96. Jonson E.D., Kotowski T.M. Detection of prostate specific antigen by ELISA // *J. Forensic Sci.* – 1993. – Vol. 38, №2. – P. 250-258.

97. Kamenev L., Leclercq M., and Frangois-Gerard Ch. An Enzyme Immunoassay for Prostate Specific P30 Antigen Detection in the Postcoital Vaginal Tract // *Journal of the Forensic Science Society.* – 1989. – Vol. 29, №4. – P. 233-241.

98. Keating, S.M. The detection of amylase on swabs from sexual assault cases / S.M. Keating, D.F. Higgs // *Forensic Sci. Int.* 1994. – Vol. 34. – № 2. – P. 89-93.

99. Laux D.L. Development of biological standards for the quality assurance of presumptive testing reagents. *Sci. Justice.* – 2011. – Vol 51, №3. – P. 143-145.

100. Romero-Montoya L., Marthnez-Rodrhuez H., Pirez M.A., Argello-Garcha R. Relationship of spermatoscopy, prostatic acid phosphatase activity and prostate-specific antigen (p30) assays with further DNA typing in forensic samples from rape cases // *Forensic Sci. Int.* – 2011. – Vol. 20;206, № 1-3. – P. 111-118.

101. Troger, H.D. Detection of saliva traces using test strips / H.D. Troger, M. Schuck, E. Tutsch-Bauer // *Forensic Sci. Int.* 1984. – Vol. 25 – № 2. – P. 143-146.

102. Tsutsumi H., Htay H.H., Sato K., Katsumata Y. Antigenic properties of human and animal bloodstains studied by enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) using various antisera against specific plasma proteins // Z Rechtsmed. – 1987. – Vol. 99, № 3. – P. 191-196.

103. Uldall, A. Visual tests for urinary amylase investigated in routine laboratory I A. Uldall // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1985. – Vol. 45. – № 2. – P. 189-192.

104. Ulenhuth. Eine metode zur Unterscheidung der verschidenen Blut-arten, im besonderen zum differential – diagnostischen Nachweis des Menscheinblutes// «Dtsch.met.Wshr.», –1901, Bd 7, – P. 82-83.

СОСТАВ РАЗРАБОТЧИКОВ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Макаров Игорь Юрьевич – директор федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист по судебно-медицинской экспертизе Министерства здравоохранения Российской Федерации, врач – судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории, доктор медицинских наук, профессор;

Гусаров Андрей Александрович – главный научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий отделением судебно-биологической экспертизы федерального государственного казенного учреждения «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Министерства обороны Российской Федерации, доктор медицинских наук;

Сурикова Наталья Евгеньевна – врач – судебно-медицинский эксперт судебно-биологического отделения с молекулярно-генетической лабораторией государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы»;

Исакова Инна Васильевна – заведующая судебно-биологическим отделением Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы» – врач – судебно-медицинский эксперт;

Сабчук Элита Петровна – врач – судебно-медицинский эксперт судебно-биологического отделения Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы», доцент кафедры судебной медицины федерального государственного образовательного бюджетного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук;

Сидоров Владимир Леонидович – судебный эксперт судебно-биологического отделения Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат биологических наук.