

Міністерство охорони здоров'я України

«УЗГОДЖЕНО»

Директор Департаменту реформ
та розвитку медичної допомоги
МОЗ України

_____ М.К.Хобзей

_____ 2013 р.

**НОВІ МЕТОДИКИ ПРИГОТУВАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ
ТА ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ СПЕРМИ В СЛІДАХ НА РЕЧОВИХ
ДОКАЗАХ**

(Методичні рекомендації)

КИЇВ – 2013

Установи-розробники:

Державна установа «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України»
Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика

Укладачі:

Бурчинський Василь Георгійович, к.мед.наук, доцент (456-60-98)

Старовойтова Ріоріта Олексіївна, к. біол.наук (456-60-98)

Дручініна Інна Миколаївна (456-60-98)

Хохолєва Тамара Володимирівна, к.мед.наук, доцент (440-97-98)

Рецензенти:

Сухий Валентин Дмитрович - директор Центру судових експертиз МО України,
Головний судово-медичний експерт МО України, к.мед.наук

Михайличенко Борис Валентинович – зав. кафедрою судової медицини

Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, д.мед.наук, професор

Голова проблемної комісії АМН та МОЗ України за фахом «Судова медицина»,
д.мед.наук, професор Мішалов В.Д.

Перелік умовних скорочень

КРА - кількісна реакція абсорбції аглютинінів

РАЕ - реакція абсорбції-елюції

РЗА - реакція «змішаної» аглютинації

АО - аридиновий-оранжевий

З М І С Т

| | |
|---|-----------|
| Вступ----- | 5 |
| | |
| Розділ 1. Приготування цитологічних препаратів за допомогою ультразвуку зі слідів виділень та крові на речових доказах | |
| 1.1. Приготування цитологічних препаратів зі слідів виділень за допомогою ультразвукової бані ----- | 7 |
| 1.2. Приготування цитологічних препаратів зі слідів крові за допомогою ультразвукової бані ----- | 7 |
| 1.3. Переваги методики приготування цитологічних препаратів за допомогою ультразвукової бані ----- | 8 |
| | |
| Розділ 2. Нові методики фарбування препаратів з метою виявлення сперми в слідах на речових доказах | |
| 2.1. Деякі особливості будови сперматозоїда----- | 9 |
| 2.2. Приготування цитологічних препаратів----- | 10 |
| 2.3. Фарбування препаратів азур -еозиновою сумішшю----- | 10 |
| 2.4. Фарбування препаратів акридиновим оранжевим (АО)----- | 12 |
| | |
| Резюме----- | 14 |
| Література----- | 15 |
| Додаток----- | 17 |

ВСТУП

Однією з важливих проблем при встановленні статевої належності крові та виділень в слідах на речових доказах у відділеннях судово-медичної цитології є вилучення клітин в якомога більшій кількості та їх подальше збереження. З метою вилучення більшої кількості клітинних елементів зі слідів біологічного походження нами була проведена експериментальна робота, яка показала, що, використовуючи ультразвук при приготуванні цитологічних препаратів, можна значно збільшити вихід клітин з досліджених об'єктів, що є новим в роботі судових експертів-цитологів, і в свою чергу дозволить покращити якість судово-цитологічних досліджень. На основі цих експериментів нами була запропонована нова методика приготування цитологічних препаратів.

Ще одним важливим питанням, яке виникає при проведенні судово-медичних експертиз, а саме, при розслідуванні статевих злочинів, є виявлення слідів сперми в слідах на речових доказах. Як відомо, методів визначення наявності сперми є дуже багато і найбільш поширеним серед них є морфологічний. Він побудований на виявленні цілих сперматозоїдів або їх головок.

В практиці роботи відділень судово-медичної імунології для виявлення сперматозоїдів в слідах на речових доказах найчастіше використовуються методики фарбування еритрозином (метод Корен-Стокіса), розчином фуксину (метод Басккі) та гематоксилін-еозином. В разі, якщо в слідах знаходяться цілі сперматозоїди, ці методики є цілком прийнятними. В той же час, коли в плямах маються зруйновані сперматозоїди, тобто тільки їх головки, диференціювання їх від інших структур (наприклад, грибків) ускладнюється, а в деяких випадках стає неможливим.

В судово-медичній цитології в якості ядерних фарбників широко використовуються азур-еозинова суміш та флюорохром - акридиновий оранжевий. Як показала практика, фарбування препаратів вищезазначеними барвниками дозволяє побачити не тільки різницю в епітеліальних тканинах різних органів, але також дозволяє виявити і поодинокі головки сперматозоїдів.

Дані методичні рекомендації запропоновані в Україні вперше, і розраховані на лікарів судово-медичних експертів-цитологів, лікарів судово-медичних експертів-імунологів та експертів-цитологів судових і експертів-імунологів-судових.

Розділ 1. Приготування цитологічних препаратів за допомогою ультразвуку зі слідів виділень та крові на речових доказах

1.1. Приготування цитологічних препаратів зі слідів виділень за допомогою ультразвукової бані

Речові докази для пошуку слідів виділень (слини на недопалках сигарет, сперми або піхвових виділень на речових доказах) оглядають в затемненому приміщенні за допомогою ультрафіолетової лампи (Вуда, КД-33Л та ін.). Зі слідів, які випромінюють блакитне світіння, роблять вирізки, половину із яких переносять в центрифужну пробірку, заливають 3 мл фізіологічного розчину та витримують 6-18 годин в умовах холодильника. Потім пробірку поміщають в ультразвукову водяну баню типу «Elmasonic S» (виробництва Німеччини) на 15 хв. Після чого предмет-носій вилучають та вміст пробірки центрифугують 5хв при 1500 об/хв. Далі проводять трьохразове відмивання осаду 10% розчином оцтової кислоти і з осаду готують цитологічні препарати по стандартній схемі. Висушені препарати очищають від видимих сторонніх домішок за допомогою пензлика і фарбують відповідними фарбниками.

1.2. Приготування цитологічних препаратів зі слідів крові за допомогою ультразвукової бані

Вирізку тканини з плямою крові (змив або зіскоб зі слідів крові) поміщають в центрифужну пробірку, заливають 3-4мл 10% розчину оцтової кислоти і залишають на 18-24 години при кімнатній температурі. Потім пробірки поміщають в ультразвукову водяну баню на 15хв, предмет-носій вилучають і проводять відмивання осаду 10% розчином оцтової кислоти три рази. З осаду

готують цитологічні препарати. Подальшу фіксацію та фарбування препаратів проводимо по стандартній схемі.

При мікрослідах крові на знаряддях травми або в піднігтьовому вмісті матеріал, що досліджується, заливають фізіологічним розчином та залишають на добу в умовах холодильника. Подальший хід приготування цитологічних препаратів аналогічний вищеописаному.

1.3. Переваги методики приготування цитологічних препаратів за допомогою ультразвукової бані

Представлена нами методика дозволяє збільшити кількість вилучених клітин в порівнянні із загальноприйнятими методиками приготування цитологічних препаратів, в середньому, в 5-7 разів.

Як показала практика, матеріал, підданий обробці ультразвуком, в подальшому може бути використаний для виявлення антигенів системи АВО методами КРА, РАЕ та РЗА.

Крім того, застосування даної методики дає можливість використовувати в експертизах значно меншу кількість матеріалу, а обробка слідів слини фізіологічним розчином дозволяє зберегти біоматеріал для подальшого дослідження методом ДНК-аналізу.

Таким чином, використання ультразвукової бані при приготуванні цитологічних препаратів зі слідів крові та виділень дозволяє значно підвищити відсоток позитивних результатів при встановленні статевої належності виділень та крові в слідах на речових доказах.

Розділ 2. Нові методики фарбування препаратів з метою виявлення сперми в слідах на речових доказах.

2.1. Деякі особливості будови сперматозоїда

Морфологічна структура сперматозоїда є дуже специфічною і відрізняється від усіх інших клітин організму людини. Сперматозоїд, що зформувався, складається з головки, середньої частини (шийки) та хвоста. Особливою унікальністю відрізняється головка сперматозоїда. Основними її компонентами є ядро, яке займає майже весь її об'єм, акросомальний чехлик, який покриває передні 2/3 ядра, та цитоплазматична або клітинна мембрана, яка одягає головку зовні та переходить на тіло і хвіст. При фарбуванні ядерними та цитоплазматичними фарбниками в головці сперматозоїда можна розрізнити дві чітко виражені зони. Як вказує С.М.Антонова та С.І.Любинська (1972), окрашена більш інтенсивно передня зона по розміру відповідає акросомальному чехлику, а задня зона, яка окрашена менш інтенсивно, відповідає задньому відділу ядра, не прикритому акросомальним чехликом.

Специфічна будова головки сперматозоїда дозволяє при фарбуванні препаратів ядерними фарбниками провести чітку диференціацію головок сперматозоїдів від інших елементів, які зустрічаються в препаратах, що в першу чергу проявляється в наявності двох зон різної інтенсивності забарвлення, їх формі та розмірах.

Треба пам'ятати, що ядра соматичних клітин в 1,5-2 рази більші, ніж головки сперматозоїдів, крім того вони відрізняються неомогенним забарвленням та нерівномірністю структури хроматину. Мікроорганізми, які теж дуже часто зустрічаються в препаратах, або значно крупніше від головок сперматозоїдів

(найпростіші), або значно менше (більшість бактерій) і не мають характерних двох зон забарвлення.

2.2. Приготування цитологічних препаратів

Приготування цитологічних препаратів може проводитися за загальноприйнятою методикою, повний опис яких представлений у методичних рекомендаціях «Визначення регіонального походження клітин при судово-медичній експертизі підозрюваних у статевих злочинах», - Київ, 2007, або за допомогою ультразвуку, як це описано вище. При приготуванні препаратів зі слідів виділень отриманий осад необхідно ресуспензувати 2-3 рази в нових порціях оцтової кислоти. При наявності значного осаду, його треба розводити у більшій кількості надосадової рідини і готувати більшу кількість препаратів, що допоможе зменшити ступінь їх забруднення та робити препарат менш щільним. Крім того, при роботі з сильно забрудненими речовими доказами цитологічні препарати після підсихання треба оглянути під стереомікроскопом та препарувальною голкою вилучити сторонні домішки великих розмірів.

2.3. Фарбування препаратів азур-еозиною сумішшю

Етапи фарбування:

- фіксація метиловим спиртом 10 хвилин;
- гідроліз 5-н розчином соляної кислоти 20 хв;
- фарбування фарбою Романовського-Гімзи або приготовленою *ex tempore* азур-еозиною сумішшю 30 хвилин;
- промивання проточною водою і диференціація препаратів підкисленою водою 2-3 сек;

- ополіскування препаратів дистильованою водою;
- підсушування препаратів;
- мікроскопія в прохідному світлі /світловий мікроскоп, окуляри 8x,10x, об'єктиви 20x, 90x, імерсійне середовище – імерсійна олія).

Примітка:

1. **Азур-еозинава суміш** готується перед застосуванням з 2-х основних розчинів: до 1 частини еозину додають 3,5 частини дистильованої води рН-7,0-7,4 та 1,5 частини розчину азуру II. Інгрідієнти обережно змішуються. Фарба повинна бути темно-фіолетового кольору.

Основні розчини готуються таким чином:

а) **Розчин азуру II** - 1,0г азуру II розчиняють в 1л свіжекип'ячої дистильованої води. До використання даний розчин повинен бути витриманий на протязі 2-х тижнів.

б) **Розчин еозину** - 1г еозину розчиняють у 1л тільки-що прокип'яченої дистильованої води.

Вказані розчини зберігаються окремо в посуді з темного скла і лише перед застосуванням змішуються у вищевказаних пропорціях. Барвники у вигляді основних розчинів мають необмежений термін зберігання.

Фарба Романовського-Гімзи – це готова азур-еозинава суміш. Робочий розчин готується *ex tempore* шляхом розведення дистильованою водою в співвідношенні 1:10.

Треба пам'ятати, що ця суміш може утворювати осад при фарбуванні, особливо влітку.

2. **Підкислена вода** - до 100 мл дистильованої води додають 1 мл 1% розчину оцтової кислоти.

3. **5-н розчин соляної кислоти** готується з відповідного фіксаналу, або беремо 41мл соляної кислоти і додаємо дистильовану воду, доводячи розчин до 100мл.

2.4. Фарбування препаратів акридиновим оранжевим (АО)

Модифікація даного методу фарбування розроблена співробітниками Горьківського / зараз - Нижньгородського/ обласного бюро судово-медичної експертизи під керівництвом проф. Загрядської А.П..

Етапи фарбування:

- фіксація етанолом 10 хвилин;
- фарбування на протязі 2-х хвилин 0,01% розчином АО, який готують на фосфатному буфері рН 6,0 ;
- промивання проточною водою 30 сек;
- диференціювання 5% розчином хлориду кальцію /CaCl₂/ на протязі 30 сек - 1 хвилини;
- промивання під проточною водою 1 хвилину;
- мікроскопія в падаючих ультрафіолетових променях за допомогою люмінесцентного мікроскопа (окуляри 4^x, 5^x, об'єктиви водяної іммерсії 40^x, 60^x, власне збільшення бінокулярної насадки 1,1^x і 1,6^x, або окуляри 10^x, об'єктиви водяної іммерсії 40^x, 60^x, іммерсійне середовище - фосфатний буфер рН- 6,0).

Якість фарбування контролюють мікроскопічно - при правильному фарбуванні сперматозоїди повинні світитися зеленуватим кольором з характерними двома зонами забарвлення. Якщо препарати перефарбовані, то

сперматозоїди набувають жовто-гарячого відтінку. В цьому випадку необхідно провести повторне диференціювання розчином хлористого кальцію з послідуєчим промиванням під проточною водою.

Цілі сперматозоїди та їх головки при фарбуванні азур-еозиною сумішшю та флюорохромом акридиновим оранжевим представлені на фото 1,2.

Фарбування препаратів азур-еозиною сумішшю або люмінесцентним фарбником – акридиновим-оранжевим може бути успішно використано для пошуку сперми як в змішаних слідах на речових доказах, так і в об'єктах судово-цитологічного дослідження, таких як, піднігтьовий вміст, знаряддя травми, мікронакладення на статевих органах осіб, які підозрюються у скоєнні статевих злочинів.

РЕЗЮМЕ

З метою збільшення позитивних результатів при судово-цитологічних дослідженнях мікрослідів біологічного походження запропонована нова методика приготування цитологічних препаратів за допомогою ультразвукової бані, яка дозволяє збільшити кількість вилучених клітин в порівнянні із загальноприйнятими методиками, в середньому, в 5-7 разів. Крім того, застосування цієї методики дає можливість готувати цитологічні препарати з меншої кількості матеріалу.

Для пошуку сперми в слідах на речових доказах за наявністю головок сперматозоїдів запропоновано фарбування препаратів азур-еозиною сумішшю та флюорохромом - акридиновим оранжевим. Ці методики широко використовуються в практиці роботи відділень судово-медичної цитології, являються доступними та простими у виконанні.

При проведенні експертиз у випадках статевих злочинів при дослідженні змішаних слідів на речових доказах з метою виявлення клітин піхвового епітелію використання вищевказаних методик дозволяє в одному препараті визначити як наявність клітин піхвового епітелію, так і сперми. Отримані таким чином дані можуть допомогти в трактуванні результатів дослідження групової характеристики змішаних слідів.

Використання вищевказаних фарбників у практиці проведення експертиз у відділеннях судово-медичної цитології показало, що при дослідженнях піднігтьового вмісту рук або мікронакладень біологічного походження поодинокі головки сперматозоїдів виявлялись навіть в тих експертних дослідженнях, де це питання не стояло. В таких випадках виявлення сперми є додатковою ознакою, що може допомогти слідчому відтворити обставини справи та розкрити злочин.

Запропоновані методичні рекомендації покращать якість судово-медичних експертиз речових доказів у випадках статевих злочинів.

Література

1. Антонова С.Н., Митяева Н.А. // Морфологическое изучение изолированных клеток (к определению органно-тканевой принадлежности наложенных на орудиях травмы).- /Судебно-медицинская экспертиза.-1972.-№1.- с.15-19.

2. Визначення регіонального походження клітин при судово-медичній експертизі підозрюваних у статевих злочинах. Методичні рекомендації.- К.: - 23с. (Бурчинський В.Г., Старовойтова Р.О., Хохолева Т.В., Ліщенко О.П.).

3. Дручиніна І.М., Старовойтова Р.О. Методика приготування цитологічних препаратів зі слідів крові з використанням ультразвукової бані. – Судово-медична експертиза.- Київ.-2011.-№4.- с.39-41.

4. Загрядская А.П., Федоровцев А.Л., Королева Е.И. Судебно-медицинское исследование изолированных клеток и микрочастиц тканей животного происхождения. - М.-:1984.- 104с.

5. Применение люминесцентной микроскопии при судебно-медицинском исследовании крови, спермы, клеток влагалищного эпителия, волос. Методические рекомендации.- Горький,1982.- 17с. (Загрядская А.П., Володин С.А., Асадчих И.П., Ольховик В.П. и др.)

6. Старовойтова Р.О., Мішалов В.Д., Кривда Г.Ф. Судово-медична цитологія (Навчально-методичний посібник).- К.- 2007.- 195с.

7. Старовойтова Р.А., Дручинина І.Н. Метод извлечения клеточных элементов из следов слюны на окурках сигарет с помощью ультразвука. – Судебно-медицинская экспертиза, 2010, №4,с.41-43.

8. Судово-цитологічні дослідження мікронакладень на знаряддях травми та в піднігтьовому вмісті /Старовойтова Р.О., Дручиніна І.М. Інформаційний лист. - Київ, 2004.-13с

9. Федоровцев А.Л., Ревнитская Л.А., Королева Е.И., Эделев Н.С. Судебно-медицинские цитологические исследования следов на вещественных доказательствах.- Нижний Новгород, 2009,152с.

ДОДАТОК

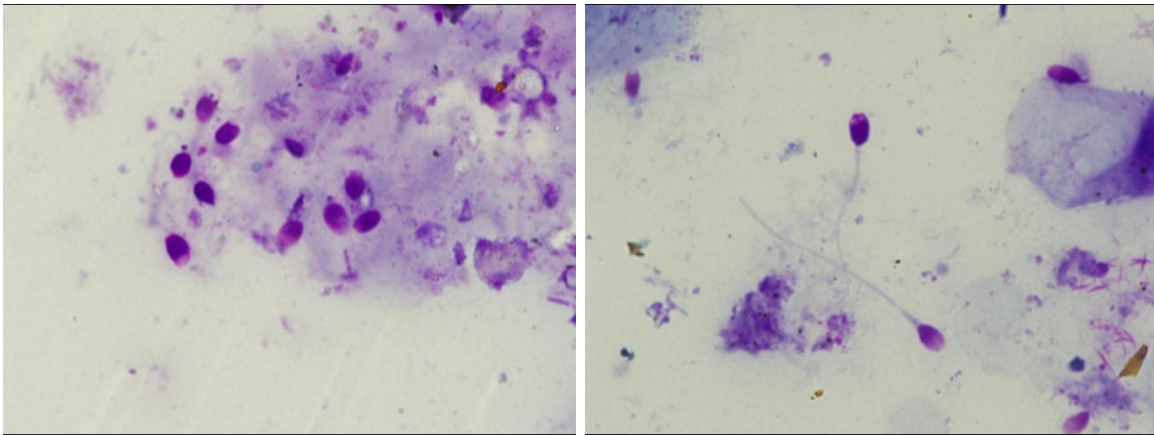


Фото 1. Головки сперматозоїдів та цілі сперматозоїди в піднігтьовому вмісті
рук потерпілої
(фарбування азур-еозиною сумішшю, світловий мікроскоп, об.100х)

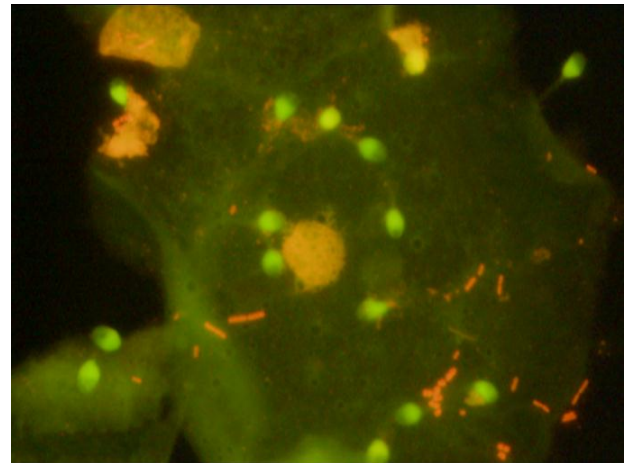
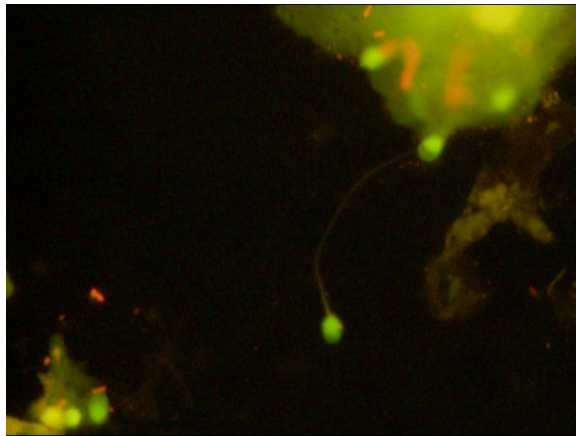


Фото 2. Головки сперматозоїдів та цілі сперматозоїди в змиві зі статевого члена
підозрюваного
(фарбування акридиновим оранжевим, люмінесцентний мікроскоп, об.60х)