

Catedra de medicină judiciară a I.M.F. din Tg.-Mureș și Laboratorul de expertize medico-judiciare al regiunii M.A.M. (cond.: conf. Z. Ander, candidat în științe medicale)

METODĂ EXACTĂ DE DIFUZIUNE ÎN GELOZĂ PENTRU IDENTIFICAREA PROTEINELOR DIN URME DE MATERIALE UMANE

V. Molnár

Metoda imunologică pentru identificarea urmelor de proteine umane a fost aplicată prima dată de *Cistovici* (2) în 1889 și modificată pentru practica medico-legală de *Uhlenhut* și *Wassermann* în 1901.

Metoda se bazează pe contactul proteinelor dizolvate, cu seruri imune suprastratificate în eprubetă dând un precipitat la nivelul suprafeței de contact. În cazul materialelor pure, precipitatul se poate aprecia ușor, dă însă reacții false dacă conține anumite impurități, din care cauză adesea rămâne inaplicabilă în practica criminalistică.

Datorită acestui fapt, începând din 1946, unii autori au încercat metoda gelatinizării prin gumă de salcîm, amestecînd-o în proporție de 4% cu anticorpi (*Müller*, 8).

În aceste condiții materialul de urmă a dat după un timp de 12—24 ore un precipitat bine apreciabil.

În ultimii 3 ani s-a introdus în practica identificării urmelor, metoda lui *Ouchterlony* (9) prin difuziune în gel de agar, folosind un gel de 1,5% agar preparat în apă și apoi aceeași reacție într-o variantă de micrometodă a lui *Hartmann*

și Toilliez (3). Ambele metode sînt efectuate în godeurile unei plăci de geloză: în centru se aplică serul imun și în godeuri circulare materialul de examinat. Godeurile sînt confecționate după răcirea și gelefierea soluției de agar.

Incercînd aceste metode am constatat numeroase inconveniente în tehnica preparării plăcilor. În gelul apos difuziunea adesea nu era uniformă și serul precipitant anti-om existent în comerț nu dădea o linie de precipitație apreciabilă, în special cu materiale de urme răzuit de pe perete, de pe materiale colorate sau de pe pămînt. Pentru înlăturarea acestor inconveniente, am folosit un gel preparat cu soluție tampon de medinal după Hirschfeld (5) folosită în electroforeza pe gel, preparînd lame cu godeuri după sugestia lui Módy (6) și un ser imun anti-om de iepure, realizat prin metoda combinată a lui Hirschfeld (4) și Prokop (10) cu modificări originale.

Metoda de lucru

1. — *Soluția tampon*: acid dietilbarbituric (veronal) 5,53 g; veronal sodic 35,03 g; lactat de calciu 5,12 g, la 10 litri de apă distilată, adăugînd 1 g de merthiolat pentru prevenirea muzezirii.

2. — *Prepararea gelului*: 10 g agar chimic pur se fierbe într-un litru soluție tampon timp de 1 oră, după care se completează cu apă distilată fierbinte cantitatea evaporată. Se toarnă în eprubete și se astupă. În acest fel gelul se poate păstra în frigider timp de 1 an.

3. — *Prepararea plăcii de gel cu godeuri*: se topește cantitatea necesară de gel, așezînd eprubetele în apă fierbinte și se întind 4,5 ml pe o lamă de microscop. Se aplică imediat o matriță pe lamă, înlăturînd-o după răcire.

Matrița este o placă de plexi-glass cu dimensiunile lamei de microscop. În colțuri sînt lipite 4 picioare de 5 mm înălțime. La 7 mm de la o margine este lipită o creastă de 1,5 mm grosime și 55 mm lungime. La o distanță de 6 mm de la această creastă sînt lipite 5 buloane cilindrice de 3 mm grosime. Atît creasta, cît și buloanele au înălțimea de 4,5 mm. Astfel, acestea nu ajung pînă la sticlă și în placa de gel, godeurile și jghiabul formate au la fund un strat de gel.

4. — *Executarea reacției*.

Materialul din urme, răzuit și uscat, este introdus într-unul din godeuri în cantitate de 0,1—1 mg și apoi se adaugă o picătură de soluție tampon (pct. 1). Pe o lamă se pot examina trei probe: în al patrulea godeu este introdusă o picătură de ser de animal în diluție de 1/20 și în ultimul godeu o picătură de ser uman în diluție de 1/20 (control negativ și pozitiv).

În jgheab se pune serul imun anti-om de iepure, în cantitate de 0,1 ml.

Preparatul este așezat în cameră umedă la temperatura camerei, timp de 24 ore. În acest timp, prin difuzarea în gel a antigenilor și anticorpilor se formează la frontul întîlnirii arcuri fine de precipitație.

Evaluarea lor se poate efectua în mod direct la lumină oblică (ținînd plăcile pe un fond negru).

5. — *Colorarea preparatelor*.

În vederea păstrării preparatelor ca probe materiale sau în scop de fotografiere se colorează:

— Se spală excesele de ser din preparat în ser fiziologic, timp de 6 ore (schimbînd soluția de clătire de 2—3 ori).

— Se usucă între 2 straturi de hîrtie de filtru, la temperatura camerei sau în termostat (37°).

— Se colorează timp de 10 minute cu soluție de amido-negru (amidoschwarz 10 B 1 g, acid acetic glacial 100 ml, alcool metilic 700 ml, apă distilată 200 ml).

— Se clățește timp de 30 de minute în același solvent (fără colorant).

— Se usucă la aer.

6. — *Prepararea serului imun anti-om de iepure*.

a) *Antigen precipitat*. Un amestec de ser uman 25 ml, apă distilată 80 ml, soluție 10% sulfat dublu de potasiu și aluminiu 90 ml. După amestecarea acestor materiale se corectează pH-ul cu soluție de 20% hidroxid de sodiu la 6,5. Se centri-

fughează și sedimentul va fi spălat de două ori cu ser fiziologic, care conține și merthiolat în proporție de 1/10.000. Apoi se face o suspensie de 100 ml tot cu acest ser fiziologic. Acest preparat se poate păstra la frigider timp de 2 săptămâni.

b) *Ser nativ*. Un amestec de ser uman diluat 1/4 cu ser fiziologic sterilizat. Se prepară proaspăt.

c) — *Antigen paraspecific*. Lichidul conținutului chistului hidatic uman sterilizat prin fierbere timp de 30 de minute și apoi fiolat.

Tabel de imunizare

Ziua I-a Antigen b + c cite 1 ml intravenos

Ziua II-a Antigen b + c cite 1,5 ml intravenos

Ziua III-a Antigen b + c cite 2 ml intravenos

Ziua IV-a Antigen a 2×5 ml intramuscular în regiunea fesieră de ambele părți

Ziua XVII-a Antigen a 2×5 ml intramuscular

Ziua XXVII-a Antigen b + c cite 1 ml intraperitoneal

Ziua XXXVII-a Recoltarea serului prin exsanguinare; se lasă singele timp de 1—2 ore la temperatura camerei, apoi în cursul nopții la frigider. A doua zi se decantează serul. Se păstrează în frigider la —20° în stare congelată. În această stare serul se păstrează la infinit.

Se verifică capacitatea de precipitare în diluții cu soluția tampon (1/2—1/512) și se utilizează concentrația optimă.

7. — *Verificarea experimentală a metodei.*

Am folosit următoarele antigene (urme experimentale):

— Singe proaspăt.

— Singe putrefiat timp de 10 zile.

— Singe putrefiat timp de 60 zile.

— Singe/uscat pe stofă, pînă, lemn, lemn vopsit, perete, nisip, placă de fier, după 10, 20, 30, 60, 100 de zile, 1 și 2 ani.

— Control pozitiv, ser uman proaspăt în diluție de 1/20.

— Control negativ ser normal de bou în diluție de 1/20.

Rezultate

— Serul proaspăt de om prezintă 4 linii de precipitație, paralele, corespunzătoare fracțiunilor proteice separate prin viteza de difuziune în gel.

— Serul bovin nu prezintă precipitație.

— Singele proaspăt integral prezintă tot 4 linii de precipitație.

— Singele putrefiat timp de 10 zile prezintă 3 linii de precipitație, cele distale fiind contopite.

— Urmele uscate pînă la 60 de zile de pe fiecare obiect, la toate prezintă 4 linii de precipitație dacă au 1 mg. Sub această cantitate găsim prezența primei linii (albumina).

— Peste 100 de zile găsim în mod regulat una sau două linii. Suportul urmelor nu a condiționat în mod apreciabil liniile de precipitație.

Sosit la redacție: 6 iulie 1964.

Bibliografie

1. BRONNIKOVA M. A., GARKAVI A. S.: Metodele și tehnicile expertizei medico-legale ale corpurilor delice. G.I.M.L. Moscova 1963; 2. CISTOVICI: cit. Bronnikova; 3. HARTMANN L., TOILLIEZ M.: Rev. franc. et clin. biol. (1957), 2, 197; 4. HIRSCHFELD J.: Science Tools, (1961), 7, 2, 18; 5. HIRSCHFELD J.: Science Tools (1962), 8, 17; 6. MÓDY J.: Comunicare personală; 7. MÜLLER M., FONTAINE G.: Ann. Med. Leg. (1963), 43, 15; 8. MÜLLER H., FONTAINE G.: Dsch. Zschr. Ges. Ger. Med. (1960), 49, 420; 9. OUCHTERLONY Ö.: Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. (1948), 26, B. 1; 10. PROKOP O.: Lehrbuch der Gerichtlichen Medizin, Vel. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1960.