

# HIGIENA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

LESŁAW OGIELSKI, EUGENIUSZ GAJOS

## Zagadnienia serologicznego badania mięsa i produktów mięsnych

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Wet. WSR we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr LESŁAW OGIELSKI

Spośród odczynów serologicznych używanych w badaniu żywności najbardziej znany jest odczyn precypitacji probówkowej Uhlenhutha. Odczyn ten umożliwia gatunkową identyfikację białek niewiadomego pochodzenia. Na popularność powyższej metody wpłynęło wiele jej cech dodatnich, takich jak szybkość i łatwość wykonania oraz odczytu wyników, proste i nieskomplikowane urządzenie laboratoryjne.

W tutejszej Katedrze opracowano kilka dalszych zagadnień serologicznego badania mięsa i produktów mięsnych. Wykonane prace w większości były inspirowane potrzebami praktyki nadzoru sanitarno-weterynaryjnego w przemyśle mięsnym oraz w przypadkach badania sądowo-lekarskiego, wymogami postępowania dowodowego w sprawach karnych.

Poniżej przedstawiono kilka zagadnień z tego zakresu. Omawiane badania zostały wykonane przy użyciu:

- 1) precypitacji probówkowej według Uhlenhutha.
- 2) precypitacji w żelu agarowym wg Ouchterlony,
- 3) immunoeletroforezy agarowej wg Scheidgera.

Jednym z warunków prawidłowych wyników precypitacji wg Uhlenhutha jest klarowność surowic precypitujących oraz badanych wyciągów. W przypadku, kiedy jeden z użytych płynów jest nieprzejrzysty, wyniki są trudne do odczytania. W przypadkach oznaczania przynależności gatunkowej białek zawartych w nieprzejrzystych roztworach zastosowano precypitację w żelu agarowym. Zasadą tej metody jest przenikanie przez agar (dyfundowanie) przeciwciał i antygenów. W miejscu ich zetknięcia powstają precypitaty, łatwo dostrzegalne na tle agaru. Jako materiał w badaniach służyły: gnijące mięso, suszone kiełbasy, w przypadkach badań sądowych plamy z krwi świeżej i rozkładającej się, zabrudzone ziemią, wapnem itp. Ponadto odpowiednimi surowicami precypitowano substancje nieprzejrzyste z natury rzeczy, takie jak mleko i żółtko jaja. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że zmętnienia pozostają w miejscu nakroplenia lub po upływie pewnego czasu dyfundują do agaru, jednak znacznie wolniej niż antygeny swoiste, biorące udział w reakcji a zatem zmętnienia badanych wyciągów nie wpływają na możliwość prawidłowych odczytów. Wykonując badanie mleka zaobserwowano, że w

odczynie probówkowym wg Uhlenhutha dodatni wynik odczytać można dopiero przy rozcieńczeniu mleka 1:60 natomiast w precypitacji w żelu można go odczytać nawet przy użyciu mleka nie rozcieńczonego.

W przypadku badania plam krwi dla celów sądowych precypitacja w żelu agarowym ma jeszcze tę zaletę, że łatwo jest sporządzić trwałe preparaty oraz zdjęcia fotograficzne, dokumentujące wykonane badania (2, 4) oraz że może być zastosowane przy badaniu bardzo drobnych śladów krwi o średnicy około 0,3, 0,5 cm, z których trudno jest uzyskać wodne wyciągi do precypitacji probówkowej. W związku z powyższym wykonano następującą modyfikację precypitacji w żelu agarowym: bardzo małe plamy z krwi wycinano lub zeskrobywano z podłoża, z części materiału wykonywano badanie mikrospektralne, natomiast pozostałą część zatapiano w płynnym agarze na szkiełkach postawowych. Po zastygnięciu agaru, wokół badanego wycinka wykonywano otwory. Do otworów wkraplano surowice precypitujące.

Jak wiadomo do badań identyfikacyjnych utrzymuje się mięso w kawałkach różnej wielkości, a czasami także mieszaniny rozdrobnionego (mielonego) mięsa. W przypadku badania mieszanin mięsa rozdrobnionego należy nie tylko stwierdzić w sposób jakościowy gatunki mięsa wchodzącego w skład mieszaniny, ale także ustalić ilościowe proporcje. Dla rozwiązania tego zagadnienia wykonano doświadczenia techniką precypitacji probówkowej Uhlenhuth'a, oparte na następującym założeniu: jeżeli np. w mieszaninie znajdują się dwa gatunki mięsa zmieszane w niejednakowych ilościach, to przy sporządzaniu wodnego wyciągu, z mieszaniny do wyciągu przejdą różne ilości rozpuszczonych białek. Wykonując rozcieńczenia wyciągu uzyskuje się szybciej wyczerpywanie zawartości białka tego gatunku, którego było mniej w mieszaninie, natomiast białko, którego było więcej utrzymuje się w większej ilości kolejnych rozcieńczeń wyciągu. Do wykonania badań używano surowice o jednakowych poziomach przeciwciał. Przy badaniu niewiadomych mieszanin sporządzano dla kontroli mieszaniny o znanym składzie jakościowym i ilościowym. Dokładność metody wynosi około 10%. Zasadę omówionej techniki badań przedstawia załączona tabela 1 (1).

Większość przetworów mięsnych w trakcie ich wytwarzania poddawana jest działaniu wysokich temperatur. Wysokość stosowanej tem-

Tab. 1

rozcień. wyciągu	Surowica precypitująca białko wołowe						Surowica precypit. białko wieprzowe					
	20% W 80% S	40% W 60% S	60% W 40% S	80% W 20% S	100% W	100% W	80% S 20% W	60% S 40% W	40% S 60% W	20% S 80% W		
1/32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/128	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
1,256	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-		
1/512	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-		
1/1024	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		
1/2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

peratury, sposób i czas jej działania (pieczenie, wędzenie, parzenie, gotowanie), grubość batonu odpowiedniej wędliny, są czynnikami wpływającymi na stopień denaturacji białek mięsa. Każdy rodzaj i gatunek przetworów mięsnych ma swoją określoną średnicę batonu, stopień rozdrobnienia mięsa, określony sposób technologicznej obróbki. W związku z tym, w jednych wędlinach wszystkie białka ulegają denaturacji cieplnej, w innych natomiast część białek posiada jeszcze zdolność do reagowania w odczynach serologicznych. Zatem przy serologicznym badaniu wędlin uzyskuje się wyniki dodatnie i ujemne. Katedra tutejsza otrzymywała próbki kiełbas celem ustalenia ich składu gatunkowego, w związku z podejrzeniami o zafałszowanie obcogatunkowym białkiem. Biorąc powyższe pod uwagę przebadano odczynem precypitacji w żelu agarowym wędliny znajdujące się w obrocie. W wyniku badań stwierdzono, że wędliny można podzielić na trzy grupy, biorąc pod uwagę wyniki odczynu precypitacji:

1. wędliny których wynik precypitacji jest dodatni
2. wędliny których wynik precypitacji jest ujemny
3. wędliny których wynik precypitacji jest ujemny lub dodatni.

W doświadczeniach wykonanych metodą precypitacji w żelu agarowym badano nie tylko wyciągi z mięsa, ale także wyciągi białek z tkanki łącznej i tłuszczu (słoniny).

Jak wykazano (3), w produktach mięsnych ogrzewanych w wyższych temperaturach nie można oznaczyć przynależności gatunkowej mięsa wchodzącego w skład wędlin, gdyż białko zdenaturowane nie reaguje z przeciwciałami precypitującymi, uzyskanymi przez uodpornianie zwierząt normalną surowicą krwi. Trudności identyfikacji gatunkowej mięsa zdenaturowanego działaniem temperatur, przy użyciu powszechnie stosowanych surowic precypitujących, były powodem wykonania doświadczeń nad sposobem wytwarzania surowic precypitujących białka ogrzewane oraz możliwo-

ści badania serologicznego białek zdenaturowanych (6). W tym celu zagęszczano wyciągi z mięsa gotowanego metodą liofilizacji, uzyskując suche, łatwo rozpuszczające się preparaty. Uzyskanymi liofilizatami uodporniano króliki. W wyniku uodporniania stwierdzono w surowicach królików obecność swoistych przeciwciał reagujących z liofilizatami termostabilnych białek mięsa oraz niekiedy z normalnymi surowicami krwi.

W toku uodporniania królików podawano zwierzętom w kilku grupach cztery rodzaje antygeny:

1) wyciąg z mięsa gotowanego w pł. fizjologicz. w stos. 1:10

2) zawiesinę rozartego, gotowanego mięsa

3) strął ogrzewanej surowicy krwi

4) liofilizaty termostabilnych białek mięsa

W dwóch pierwszych przypadkach nie uzyskano przeciwciał precypitujących, prawdopodobnie z tego powodu, że antygen zawierał zbyt mało białka termostabilnego, a białko termostabilne, było zdenaturowane pod wpływem gotowania. W trzecim przypadku otrzymano przeciwciała reagujące jedynie z normalną surowicą krwi. Reakcja była swoista. W czwartym przypadku króliki wytworzyły przeciwciała, reagujące z roztworami liofilizatów termostabilnych białek oraz niekiedy także i z normalnymi surowicami krwi. Wszystkie odczyny przebiegały w sposób swoisty. Wyniki powyższych badań można zebrać w cztery punkty:

1) białko termostabilne posiada słabe własności antygenowe

2) otrzymane surowice precypitujące białko gotowane posiadały niskie miana przeciwciał

3) uzyskane surowice precypitujące reagowały w sposób swoisty

4) reakcje zachodziły z roztworami termostabilnych białek gotowanych mięsa oraz z białkami normalnych surowic krwi.

W przypadkach postępowania dowodowego w sprawach karnych Katedra otrzymywała próbki mięsa drobiu z prośbą o ustalenie gatunku. Zagadnienie to jest trudne, bowiem w przypadkach serologicznego badania białek ptaków domowych (kura, indyk, kaczka, gęś) obserwuje się zjawisko precypitacji grupowej. Uodpornianie królików np. surowicą krwi kury, powoduje wytwarzanie się przeciwciał precypitujących białko kury oraz indyka, kaczki i gęsi. W związku z powyższym, dla wyjaśnienia zjawisk precypitacji grupowej i serologicznego pokrewieństwa białek ptaków domowych oraz możliwości ich różnicowania, wykonane zostały badania metodami elektroforezy i immunoelektroforezy agarowej mikrometodą Scheideggera białek surowic krwi w/m ptaków przy zastosowaniu króliczych surowic precypitujących (7).

Z wykonanych doświadczeń wysnuto następujące wnioski:

1) Każda z czterech rodzajów surowic precypitujących białka drobiu posiadała przeciwciała nie tylko dla białka homologicznego, ale także i dla heterologicznych białek pozostałych trzech gatunków ptaków domowych. Poziom przeciwciał oznaczony precypitacją w żelu agarowym był jednakowy dla białek homologicznych i heterologicznych.

2) Kolejność zmniejszania się ilości frakcji przeciwciał w posiadanych surowicach precypitujących była następująca dla badanych białek drobiu:

surowica precypitująca białka kury: kura, indyk, gęś, kaczka,

surowica precypitująca białka indyka: indyk, kura, gęś, kaczka,

surowica precypitująca białka kaczki: kaczka, gęś, kura, indyk,

surowica precypitująca białka gęsi: gęś, kaczka, indyk, kura.

3) Badaniem elektroforetycznym wykazano różnice w szybkości migracji białek poszczególnych gatunków ptaków. Największą szybkość migracji wykazywały albuminy surowicy kurzej, najmniejszą zaś albumina surowicy indyka. Gammaglobuliny surowicy indyka wykazywały największą szybkość migracji w polu elektrycznym. Białka surowic kaczki i gęsi pod względem szybkości wędrowania wykazują małe różnice.

Swoistość serologiczna w obrębie białek ptaków domowych cechuje surowice krwi, białko i żółtko jaja kurzego. Jak wiadomo odczyn precypitacji próbówkowej wg Uhlenhutha jest zawsze dodatni przy użyciu surowic precypitujących proteiny kurze i takich substancji, jak surowica krwi, białko i żółtko jaja kurzego.

Dodatnie wyniki precypitacji próbówkowej nie wyjaśniają pytania czy wszystkie rodzaje białek biorą udział w reakcji, bowiem dodatni wynik odczynu przejawia się w każdym przypadku pojawieniem się jednej warstwy (pozor- nie jednolitego) precypitatu. Tak więc nie wiadomo ile frakcji białkowych surowicy krwi lub żółtka jaja jest strącanych przez surowicę precypitującą białko jaja; jakie reakcje daje w takich przypadkach surowica precypitująca żółtko jaja; jak reaguje z białkiem i żółtkiem jaja precypityna dla surowicy krwi kurzej; czy surowica krwi, białko i żółtko jaja, obok wspólnych posiadają także oddzielne białka lub ich frakcje, właściwe dla każdej z nich.

Dla wyjaśnienia powyższych zagadnień wykonano badania używając wymienione surowice precypitujące i antygeny pochodzenia kurzego (8). Doświadczenia wykonano techniką precypitacji w żelu agarowym i immunoelektroforezy agarowej.

Wyniki badań streszczają się w następujących wnioskach:

1) Uodpornianie królików (oddzielnie) białkiem, żółtkiem jaja, surowicą krwi kurzej prowadzi do wyprodukowania precypityn reagujących

dotychczas z każdą z substancji użytą do uodporniania.

2) Krzyżowo wykonany odczyn precypitacji w żelu agarowym (każda precypityna z każdym antygenem) wykazuje, poza wynikiem dodatnim, różne nasilenie precypitacji, tak pod względem ilości pasm precypitatu, jak też ich intensywności,

3) W białku i żółtku jaja zauważono obecność specyficznych białek, których brak jest w surowicy krwi,

4) Badania immunoelektroforetyczne wykazały zjawisko pokrewieństwa antygenów kurzych, głównie w grupie albumin.

5) Surowica krwi kurzej ma więcej wspólnych frakcji białkowych z żółtkiem, niż z białkiem jaja,

6) Żółtko ma więcej białek wspólnych z białkiem jaja, niż z surowicą krwi.

Omówione publikacje (ogłoszone oraz przygotowane do druku) stanowią jedynie część zagadnień będących tematem badań pracowni serologicznej. Jest rzeczą oczywistą, że przedstawione problemy nie rozwiązują wszystkich zagadnień stojących przed serologią dotyczącą produktów żywności i niektórych zagadnień z medycyny sądowej.

#### Piśmiennictwo

- Ogielski L., Brzecka K., Gajos E.: Oznaczenie ilościowego stosunku dwóch gatunków mięsa w mieszaninie, metodą precypitacji. *Medycyna Wet.* nr 9, 533 (1957).
- Gajos E.: Oznaczenie pochodzenia gatunkowego białek w nieprzejrzyistych płynach. *Zeszyty Naukowe WSR we Wrocławiu. Weterynaria IX*, 33 (1960).
- Gajos E.: Przydatność metody precypitacji w przypadku serologicznego badania wędlin. *Przemysł Spożywczy* 6, 32 (1961).
- Gajos E.: Primenientje diffuzionnoj precipitacji k is-sledowaniju pischczewych produktow i sudiebnych wieszczestwiennych dokazatelstw. *Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16, 415 (1960).
- Gajos E.: De la possibilite de l'examination serologique tres petites taches de sang. *Acta Medica Hungaricae* 1962 (w druku).
- Ogielski L., Gajos E.: Precypitacja termostabilnych białek mięsa. Praca zgłoszona na II Zjazd PTNW. Wrocław 1962.
- Gajos E.: Immunoelektroforetyczne badanie surowic krwi niektórych ptaków domowych. Praca zgłoszona na II Zjazd PTNW. Wrocław 1962.
- Gajos E.: Precypitacyjne oraz immunoelektroforetyczne badanie białka, żółtka jaja, surowicy krwi kurzej (praca przygotowana do druku).

**WOSKOBOJNIKOW W. M.: Dożylnie wlewianie nowokainowo-penicylinowego roztworu przy zapaleniach wymion. (Wnutriwiennoje wwidienije nowokain-penicillinowego rastwora pri mastitach).** *Weterynaria* 10/61.

Autor stosował przy leczeniu zapalenia wymion u krów dożylnie wlewania 0,25—0,5% roztworu nowokainy w wodzie destylowanej w dawce wynoszącej 0,1—0,2 suchej substancji na 100 kg/w. Przed wprowadzeniem na każde 100 ml tego roztworu dodawano 300—500 tys. jedn. penicyliny. W przypadkach zadawanych powtarzano wlew po 4—5 dniach. Ustalono, że dożylnie wprowadzanie nowokainy-penicyliny jest skutecznym środkiem leczniczym przy surowiczej i nieżytowej postaci zapalenia wymion u krów, natomiast nie nadaje się do leczenia postaci nieżyto-włóknikowych i włóknikowych.

F. Klepaczko