

W przypadkach podejrzenia choroby hemolitycznej nowonarodzonych prosiąk Pracownia Immunologiczna Zakładu Hodowli Doświadczalnej Zwierząt P. A. N., Bydgoszcz, ul. Świerczewskiego 5, tel. 30-93, chętnie udzieli — w miarę możliwości — pomocy w ustaleniu rozpoznania.

Piśmiennictwo:

1) Berthelon M., Meynard J. A.: Rev. Med. Vet., 1949, 100, 113, 2) Brion A.: Rev. Med. Vet., 1949, 11, 229, 3) Bruner D. W., Hull F. E., Doll E. R.: Amer. Journ. Vet. Res., 1948, 9, 237, 4) Bruner D. W., Brown G. C., Hull F. E., Kinkaïd A. S.: J. Amer. Vet. Med. Assoc., 1949, 115, 94-96, 5) Caroli J., Bessis M.: Rev. Hematol., 1947, 2, 207, 6) Dujarric R., De La Riviere et Eyquem: Les groups sanguins chez les

animaux, Editions Médicales, Flammarion, Paris, 7) Hirszfeld L. i Zborowski H.: Med. Dośw. i Społ., 1926, 6, 5, 8) Hirszfeld L.: Immunologia ogólna, 1948, „Czytelnik”, 9) Hirszfeld L.: Archiwum Immunologii i Terapii Doświadczalnej 1953, I, 50, 10) Konserwowanie i przetwarzanie krwi, pod redakcją Artura Hausmana, Warszawa, 1954, P.Z.W.L. 11) Lille-Szyszkowicz J. i Woyciechowska St.: Roczniki Nauk Rolniczych, 1956, Tom 67 E-4, 12) Krzysztoporski S.: Archiwum Immunologii i Terapii Doświadczalnej, 1953, I, 63, 13) Landsteiner K. i Wiener A.: J. Immunol., 1937, 33, 19, 14) Levine P. E., Katzin E. M. i Burnham L.: J. Am. Med. Ass., 1949, 116, 823, 15) Szent-Iványi Tamás i Szabo István: Magyar Allatorvosok Lapja, 1952, 11, 16) Szent-Iványi Tamás i Szabo István: Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae, 1954, IV, 4, 429, 17) Szabo István, Szent-Iványi Tamás i Székely Antal: Magyar Allatorvosok Lapja, 1956, 3; w języku angielskim: Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae, VI, 2-3, 313.

WŁADYSŁAW BARNECKI, ZDZISŁAW WALICKI

*Oznaczanie frakcji białkowych surowicy krwi u krów i świń

Z Katedry Fizjologii Wydz. Weterynaryjnego W.S.R. we Wrocławiu
Kierownik: Z. Prof. dr WŁADYSŁAW BARNECKI

Ilościowe oznaczanie zmian poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi w odniesieniu do ich prawidłowych wartości oraz do wzajemnych stosunków pomiędzy poszczególnymi frakcjami w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych wzbudza coraz większe zainteresowanie w medycynie weterynaryjnej (2, 3, 5, 7, 8, 10). Klasyczną metodą oznaczania frakcji białkowych surowicy krwi jest ich wysalanie. Wg Hofmeistra i Spiro polega ona na tym, że po dodaniu do roztworu białek soli w odpowiednim stężeniu, szczególnie soli metali lekkich, sól powoduje odciąganie wody od cząstek białka, wskutek czego ciało staje się nierozpuszczalne i wypada jako osad. Nowsze metody frakcjonowania białek krwi to wytrącanie alkoholem w niskiej temperaturze kolejno różnych frakcji, elektroforeza, w której oddzielenie poszczególnych frakcji oparte jest na różnych ładunkach elektrycznych tych frakcji, ultrawirowanie i inne. Te metody frakcjonowania pozwoliły znacznie pogłębić naszą wiedzę o białkach; jednak badania takie są możliwe w dobrze wyposażonych laboratoriach dysponujących dość skomplikowaną aparaturą i wieloma odczynnikami, poza tym przeprowadzenie analizy wymaga dłuższego czasu.

Zadaniem niniejszej pracy było oznaczenie frakcji białkowych surowicy krwi u krów i świń w oparciu o metodę Aull i Mc Cord (1) w modyfikacji Garleja (4), która ze względu na prosty sposób przeprowadzenia analizy oraz łatwo dostępny sprzęt i odczynniki wydaje się godną uwagi. Z tego też względu przytaczamy opis metody:

Przyrządy: kolorymetr Dubosqua (prod. krajowej), pipety, próbki. Odczynniki: roztwór zawierający 2268 g fosforanu potasu pierwszorzędowego (KH_2PO_4) i 335 g ługu sodowego ($NaOH$) w 5000 ml wody. W 4000 ml wody rozpuszczamy na gorąco najpierw ług sodowy a następnie fosforan. Po dokładnym rozpuszczeniu roztworu dodajemy wody do 5000 ml. Jest to roztwór podstawowy, z którego sporządzamy 4 roztwory rozcieńczone.

Roztwór nr 1 zawiera 1235 g roztw. podst.
+ wody do 1 litra
Roztwór nr 2 zawiera 1000 g roztw. podst.
+ wody do 1 litra
Roztwór nr 3 zawiera 785 g roztw. podst.
+ wody do 1 litra
Roztwór nr 4 zawiera 625 g roztw. podst.
+ wody do 1 litra

Sposób wykonania analizy: po ustawieniu w stelażu 5 próbek do czterech pierwszych wlewamy po 10 ml poszczególnych rozcieńczeń. Do ostatniej 1 ml surowicy + 1,5 ml wody + 7,5 ml roztworu podstawowego, mieszamy przez odwracanie i przenosimy po 1 ml mieszaniny do czterech pierwszych próbek. Mieszamy je przez odwracanie i odstawiamy na 15 minut. Przez ten czas następuje wysolenie poszczególnych frakcji białkowych. W roztworze nr 1 wysala się całe białko, w roztworze nr 2 wysalają się tylko globuliny (albuminy się rozpuściły), w roztworze nr 3 wysalają się tylko β i γ globuliny (rozpuściły się także α globuliny), w roztworze nr 4 wysalają się tylko γ (rozpuściły się albuminy i α oraz β globuliny).

Przez okres 15 minut przewidziany na wysalanie można oznaczyć stężenie białka całkowitego w surowicy krwi metodą Philipsa i Van Slyke'a. Metoda ta jako niezwykle prosta i szybka wystarcza z powodzeniem w praktyce klinicznej. Jedyń odczynnik sporządza się następująco: robi się nasycony roztwór siarczanu miedzi, a z niego roztwór podstawowy o ciężarze właściwym 1,100 (100 ml tego roztworu ma ważyć 110 g). W tym celu w zależności od temperatury bierze się przy:

15°C — 529 ml	21°C — 480 ml	26°C — 447 ml
16°C — 521 ml	22°C — 473 ml	27°C — 442 ml
17°C — 512 ml	23°C — 466 ml	28°C — 436 ml
18°C — 504 ml	24°C — 460 ml	29°C — 431 ml
19°C — 496 ml	25°C — 453 ml	30°C — 425 ml
20°C — 488 ml		

nasyconego roztworu i dopełnia wodą destylowaną do 1000 ml. Roztwory wzorcowe siarczanu miedzi od c. wł. 1,020 do c. wł. 1,040 sporządzamy z roztworu podstawowego o c. wł. 1,100, na przykład: roztwór wzorcowy o c. wł. 1,028 otrzymuje się przez zmieszanie 27 ml siarczanu miedzi o c. wł. 1,100 z 73 ml wody destylowanej, roztwór o c. wł. 1,035 przez dodanie do 34 ml siarczanu miedzi o c. wł. 1,100 66 ml wody. Takie roztwory wzorcowe służą do około 100 oznaczeń. Mając sporządzone w szklanych butelkach roztwory wzorcowe o wzrastającym c. wł. wpuszczamy do nich kolejno kroplę surowicy. Ciężar właściwy surowicy badanej jest równy c. wł. roztworu wzorcowego tam — gdzie kropla surowicy wpuszczona do naczynka z wysokości

1 cm utrzymuje się w połowie wysokości słupa roztworu między 5 a 15 sekundą tworząc przy tym równy nierozpływający się pierścień ze ściętego białka. Stężenie białka w surowicy krwi obliczamy wg wzoru (6,9):

$\% \text{ białka sur. krwi} = 360 \times (\text{c. wł. surowicy krwi} - 1,007)$.

Po 15 minutach wysalania frakcji porównuje się w kolorymetrze stopień zmętnienia rozcieńczeń nr. 2, 3 i 4 w odniesieniu do zmętnienia roztworu nr 1. Nurnik (pręt szklany) zanurzamy w kiuwecie z roztworem nr 1, np. na odległość 10 mm od dna kiuwety, a w drugim tak aby zrównać zabarwienie obu pól. Należy pamiętać o przepłukaniu kiuwet roztworem badanym, oraz o tym że pola optyczne są przeciwległe do kiuwet. Czynność zrównania zabarwienia w kiuwecie z roztworem 2, 3 i 4 w odniesieniu do kiuwety z roztworem 1 powtarzamy 2 do 3-ch razy odczytując każdorazowo wysokość zanurzonego pręta szklanego, a przy ewentualnie różnych odczytach bierzemy średnią. Obliczamy biorąc pod uwagę, że stężenie wysolonej frakcji zmienia się odwrotnie proporcjonalnie do kwadratu wysokości warstwy prześwietlanej a nie wprost proporcjonalnie jak w zwykłej kolorymetrii.

Przykład: w roztworze nr 1 ustawiliśmy nurnik w odległości 10 mm od dna kiuwety. W roztworze nr 2 po zrównaniu barwy obu pól nurnik znalazł się na wysokości 14 mm od dna kiuwety, w roztworze nr 3 na wysokości 17 mm, a w roztworze nr 4 na wysokości 22 mm. Zawartość białka w surowicy krwi obliczona met. Philipsa i Van Slyke'a wyniosła np. 7,2 g^o%. W roztworze nr 1 jest 7,2 g^o% białka. W roztworze nr 2 wysoliły się globuliny, których stężenie wynosi $\left(\frac{10}{14}\right)^2 \times 7,2 = 3,66 \text{ g}^0\%$, wobec czego albuminy stanowią 7,2 — 3,66 = 3,54 g^o%. W roztworze nr 3 wysoliły się β i γ globuliny, których stężenie wynosi $\left(\frac{10}{17}\right)^2 \times 7,2 = 2,48 \text{ g}^0\%$, wobec tego α globuliny stanowią 3,66 — 2,48 = 1,18% g. W roztworze nr 4 wysoliły się γ globuliny, których stężenie wynosi $\left(\frac{10}{22}\right)^2 \times 7,2 = 1,48 \text{ g}^0\%$, wobec tego β globuliny stanowią 2,48 — 1,48 = 1,0 g^o%.

Badania własne

Przebadano surowicę krwi 48 krów i 45 świń różnego wieku pochodzących z materiału rzeźnianego. W badanych surowicach stężenie białka całkowitego obliczone met. Philipsa i Van Slyke'a wynosiło u krów od 6,84 do 7,56, u świń od 7,2 do 7,92 g^o%. W poniższej tabeli zestawiono wyniki badań przeprowadzonych przez nas w porównaniu z wynikami otrzymanymi metodą elektroforezy bibułowej przez W. Stöckla (7). Poziom poszczególnych frakcji wyrażony jest w stosunku procentowym do białka całkowitego.

	Krowy		Świnie	
	Wysalanie	Elektroforeza	Wysalanie	Elektroforeza
Albuminy	38,8—55,8	31,7—56,2	30,8—65,6	31,2—59,0
α —Globuliny	11,3—22,2	9,3—22,4	9,3—26,3	13,8—21,1
β —Globuliny	8,1—23,6	5,8—19,4	8,8—23,3	10,5—19,9
γ —Globuliny	15,9—30,7	19,0—44,3	15,1—30,6	15,8—32,4

Wnioski

Porównanie oznaczeń frakcji białkowych u krów i świń uzyskanych wysalaniem wg met. Garleja z metodą elektroforezy bibułowej wykazuje dość znaczną zgodność wyników, co pozwala spodziewać się, że powyższa metoda może znaleźć również zastosowanie w badaniach klinicznych frakcji białkowych surowicy krwi u zwierząt.

Piśmiennictwo:

- 1) Aull J. C., McCord W. M.: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine Vol. 46, nr 3, 1955.
- 2) Chopard P.: Schweizer Arch. f. Tierheilkunde 5, 252, 1954.
- 3) Działoszyński L., Maciejewska M.: Med. Wet. XII, 3, 1957.
- 4) Garlej T.: Wiad. Lek. 19, 879, 1956.
- 5) Juško-Grundboeck J.: Med. Wet. XIII, 3, 1957.
- 6) Marek J., Mosey J.: Lehrbuch der Klinischen Diagnostik der Inneren Krankheiten der Haustiere.
- 7) Stöckl W.: Wien. Tier Wochenschr. 43, 3, 4, 7, 1956.
- 8) Szurman J., Hanisch J.: Med. Wet. XII, 1, 1956.
- 9) Wirth D.: Grundlagen einer Klinischen Hämatologie der Haustiere 1950.
- 10) Verorel J. J.: dysertacja doktorska 1955, Paryż.

В. БАРНЕЦКИ, З. ВАЛИЦКИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КОРОВ И СВИНЕЙ

Авторы сравняли результаты определений белковых фракции в сыворотке крови коров и свиней путём высаливания и путём бумажного электрофореза и определили, что метод высаливания может найти применение для клинических услуг.

W. BARNECKI and Z. WALICKI

DETERMINATION OF PROTEIN FRACTIONS OF THE SERA OF COWS AND PIGS

Summary

A comparative study of results of the determination of protein fractions of sera of cows and pigs by using the salting out method and paper electrophoretic method. The salting out method can be applied to clinical examinations.