

HIGIENA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

EUGENIUSZ GAJOS

○ swoistości surowic precypitujących

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Wet. W.S.R. Wrocław
Kierownik: Doc. dr L. OGIELSKI

Wśród całego szeregu metod badań, opartych na naukowych podstawach, a mających na celu oznaczenie gatunku białka, nie znamy żadnej, która czułością, dokładnością i swoistością działania przewyższałaby próbę precypitacji. Wiadomo, że w ten sposób można badać jedynie te substancje, które są antygenem (precypitynogenem) pełnym lub niepełnym. Przy precypitacji bowiem, jak i przy wszystkich pozostałych odczynach serologicznych, ciała i związki nieantygenowe nie wchodzi w rachubę, jako że w reakcjach tych nie biorą czynnego udziału.

Próba precypitacji w ciągu z górą pięćdziesięciu lat od czasu jej odkrycia, znalazła zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i praktyki. Pozwala bowiem wykazać obecność białka w rozcieńczeniu 1:80 — 1:100.000, a nawet według danych cytowanych w piśmiennictwie (Uhlenhuth) w rozcieńczeniu 1:200.000.

Wielocukry bakteryjne, które pomimo iż nie są ciałami białkowymi, posiadają własności antygeny prostego i jak podaje Zabłocki można je wykryć drogą precypitacji w rozcieńczeniach 1:2.000.000 — 1:5.000.000. Poza tak dużą czułością, odczyny serologiczne cechuje wybitna swoistość działania, tak więc można oznaczyć bardzo drobne nieraz ilości antygeny, ustalając równocześnie jego pochodzenie gatunkowe. Stąd też wynika szerokie zastosowanie precypitacji w badaniach naukowych i diagnostycznych w bakteriologii, higienie żywności, medycynie sądowej itp.

W pracy z 1956 r. (Przemysł Rolny i Spożywczy) Wandokanty i współpracownicy, wykazali drogą chromatografii bibulowej różnice współczynników RF czyli długości linii wędrowania różnych gatunków białek, przy czym jak podano, różnice między poszczególnymi gatunkami, są istotnie dostrzegalne, co uwidoczniono na załączonych zdjęciach takich proteinogramów.

Być może w przyszłości metodyka ta okaże się przydatną w pracy laboratoryjnej, niemniej na razie, z uwagi na stosunkowo niewielką ilość oznaczeń, tak pod względem gatunków zwierząt jak i ilości wykonanych chromatogramów, badanie to nie przedstawia większego znaczenia praktycznego.

Zatem, oznaczanie w sposób pewny pochodzenia gatunkowego i drobnych ilości białka może być wykonane jedynie metodą precypitacji.

Do wykonania odczynu precypitacji potrzebne są dokładnie oznaczone, swoście działające surowice precypitujące o odpowiednio dużej ilości przeciwciał (precypityn) czyli tzw. mianie. Wymagane miano dla surowic precypitujących wynosi 1:10.000.

Jedną z zasadniczych trudności przy produkcji diagnostycznych surowic precypitujących jest ich nieswoistość. Surowice bowiem bardzo często reagują nie tylko z antygenem homologicznym, lecz i z heterologicznym. Np. uodparniając królika białkiem wołowym uzyskuje się przeciwciała dla białka wołowego oraz pokrewnego gatunkowo białka owczego, koziego, wielbłądniego, czasami nawet dla obcogatunkowego białka końskiego lub wieprzowego.

Współmiana precypitacyjne w obrębie gatunku (wół — owca — koza; koń — osioł; świnia — dzik;) są nie do uniknięcia przy takim sposobie uodparniania z uwagi na grupowe podobieństwo antygenów. Innym zagadnieniem są współmiana z białkiem heterologicznym, które zmniejszają wartość surowic, gdyż uzyskane wyniki nie są pewne.

Sprawę współmian w surowicach precypitujących przepisy normują w ten sposób, że do obrotu dopuszcza się jedynie takie surowice, które wykazują zupełną swoistość, względnie których współmiano z białkiem heterologicznym nie wynosi więcej niż 10% miana zasadniczego. W przeciwnym razie surowica nie nadaje się do użytku.

Powstawanie współmian w surowicach diagnostycznych tłumaczy się następstwem pokrewieństwa serologicznego podawanych antygenów różnie daleko oddalonych od siebie w rozwoju filogenetycznym np: wół, koń, świnia, człowiek, świnia itd. Co do tego immunologia podaje szereg hipotez:

1. antygeny posiadają na swojej powierzchni ugrupowania wspólne dla antygenów różnych grup (gatunków),

2. surowica posiada różne typy przeciwciał, które reagują z różnymi antygenami,

3. przeciwciała reagują z antygenem heterologicznym różniącym się od homologicznego.

Ostatecznie zagadnienie powstawania współmiana w surowicach nie zostało jeszcze rozwiązane i prace w celu jego wyjaśnienia przeprowadzane są w dalszym ciągu.

Z uwagi na to, że produkcja surowic jest bardzo pracochłonna i wymagająca stosunkowo dużych nakładów finansowych od dawna starano się wykorzystywać nieswoiste surowice

poprzez wyabsorbowanie niespecyficznego przeciwciała. W związku z tym opracowano szereg metod, których przegląd podany zostanie poniżej.

Metoda szczepienia krzyżowego

Uhlenhut stwierdził, że uodparniając królika białkiem konia uzyskuje się przeciwciała także i dla białka osła. Poziom ich może być taki sam jak i dla białka konia, a niekiedy niższy. Niemniej tą drogą nie udaje się uzyskać przeciwciała wyłącznie dla białka końskiego, zawsze towarzyszą im przeciwciała dla innych koniowatych.

Podając białko konia osłu, a białko osła koniowi można uzyskać przeciwciała reagujące w pierwszym przypadku wyłącznie z białkiem konia, a w drugim osła. Wg Uhlenhuta w ten sposób uzyskuje się surowice całkiem swoiste w obrębie gatunku, gdyż koń uodparniany białkiem osła wytworzy przeciwciała wyłącznie dla białka osłego, gdyż w myśl podstawowych zasad immunologii organizm nie wytwarza przeciwciał dla białka własnego gatunku. W ten sposób można różnicować białka pokrewnych gatunków: koń — osioł, zając — królik, świnia — dzik, itd.

Metoda ta jakkolwiek prosta w założeniu i dająca zadowalające wyniki nie zawsze jest możliwa do zastosowania chociażby z uwagi na brak odpowiednich zwierząt.

Dlatego też w pewnych przypadkach nieswoistych surowic stosuje się metodę absorpcji przeciwciała.

Metoda absorpcji *in vitro*

W przypadku nieswoistych przeciwciał pożyteczna może okazać się metoda absorpcji heterologicznym białkiem. Do surowicy precypitującej celem usunięcia niespecyficznego przeciwciała dodaje się surowicy tego gatunku, które przeciwciała należy wyeliminować. Surowicę dodaje się niewielkimi ilościami i odwiruje się powstałe strąty nieswoistych precypitatów. Z chwila, kiedy po dodaniu białka precypitaty nie powstają mianuje się surowicę i jeżeli nie ma współmian, kończy się absorbcję.

Jak podaje Rozenberg i wsp. uodparniano króliki białkiem wołu, barana i kozy uzyskując surowicę, które reagowały ze wszystkimi trzema gatunkami białek. Absorbując białkiem poboczne przeciwciała udało się uzyskać surowicę swoistą wyłącznie dla białka wołu, kozy lub barana. W surowicach po absorpcji obserwowano spadek mian a także różnie długi okres precypitacji.

Do absorpcji tego rodzaju, nadają się jedynie takie surowice, które mają miano zasadnicze znacznie wyższe niż 1:10,000, gdyż przy absorpcji miano spada niekiedy bardzo wyraźnie, co powodowane jest wychwytywaniem przeciw-

ciał przez antygen oraz rozcieńczeniem surowicy.

W celu zapobieżenia rozcieńczeniu surowic precypitujących stosuje się niekiedy absorbcję odpowiednim liofilizowanym białkiem, które przedstawia się jako proszek szybko i dokładnie rozpuszczający się w wodzie. Dodany do nieswoistej surowicy rozpuszcza się wychwytyjąc przeciwciała.

Metoda absorpcji *in vivo*

Nowszym sposobem absorbowania nieswoistych surowic jest absorbcja *in vivo*. Polega ona na tym, że królikowi przed skrwawieniem podaje się dożylnie heterologiczne białko (surowice). W ten sposób jak podaje Nischegordzeff można uzyskać swoistą surowicę pozbawioną współmian. Skrwawienie królika powinno być wykonane w ciągu 1 godz. od podania białka królikowi. Wg nieogłoszonych doświadczeń Brzeckiej wiadomo, że skrwawienie królika po 12 godzinach od chwili podania absorbującej dawki białka pozwoli przeprowadzić absorbcję, natomiast uzyskuje się mętną, nieklarowną surowicę. Jako dalsze spostrzeżenia tej autorki należy podkreślić fakt, że stosując powyższą absorbcję *in vivo*, udaje się wyabsorbować współmiana dla więcej niż jednego gatunku.

Metoda powyższa stosowana w praktyce dała dobre wyniki, chociaż surowice absorbowane *in vivo* wykazują stosunkowo szybki spadek miana w trakcie przechowywania.

Metoda rozcieńczania

W wypadku kiedy surowica precypitująca posiada wysokie miano w stosunku do antygenu homologicznego, natomiast dla heterologicznego znacznie niższe, można przeciwciała niespecyficzne wyeliminować poprzez rozcieńczenie surowicy płynem fizjologicznym.

Stosując odpowiednie przeliczenia ilościowe, obniżwszy wprawdzie miano zasadnicze, można poprzez rozcieńczenie obniżyć lub zupełnie wyeliminować występujące współmiana.

Rozcieńczenie nieswoistych surowic można dokonać także przy pomocy surowicy gatunku nie wchodzącego w reakcję w danym wypadku. Wyniki są w zasadzie jednakowe i bardziej zbliżone do naturalnych, niż przy stosowaniu do rozcieńczeń płynu fizjologicznego.

Piśmiennictwo

- 1) P. Uhlenhuth: Die biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen und Tierblut. Jena 1905.
- 2) P. Uhlenhuth, O. Weidanz: Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909.
- 3) H. Pfeiffer - Graz: Der biologische Blutnachweis 1923.
- 4) E. Mikulaszek: Podstawy immunologii 1956.
- 5) L. Hirszfild: Immunologia ogólna 1949.
- 6) Wydanie zbiorowe: Sbornik naučných rabot po sudiebnój medicinie i pograničnym obšastiam. Moskwa 1955.
- 7) B. Zabłocki: Podstawy chemii bakteryjnej 1955.
- 8) B. Zabłocki: Immunologia 1955.
- 9) W. C. Boyd: Fundamentals of Immunology 1956.
- 10) Zeszyty Problemowe „Kosmosu” zeszyt 3: Zagadnienia współczesnej immunologii 1956.