

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Józef Parnas
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Śląska Akademia Medyczna. Zabrze 8 — Rokitnica
Kierownik: prof. dr Jerzy Szafiarski

Zenon DUDZIAK, Stanisław SCHELLER,
Jan SZURMAN, Leonia URBAŃSKA,
Genowefa PANEK

**Badania nad antygenami martwiczymi. Próby frakcjonowania antygenów
gruźliczego sera bydlęcego**

**Исследования мертвых антигенов
Пробы фракционирования антигенов скотского „casum”**

**A Study of the Necrotic Antigens. Trials of Fractionation of Bovine
Caseous Antigens (TBC)**

Celem pracy były próby określenia charakteru antygenów obecnych w wyciągu wodnym sera gruźliczego oraz ewentualnego otrzymania ich w formie oczyszczonej.

MATERIAŁ I METODYKA

Antygeny. Posługiwano się wodnymi wyciągami gruźliczych serów bydlęcych, których sposób preparowania podano uprzednio (5). W badaniach użyto kilku różnych serów gruźliczych.

Surowice. Używano surowic anty-serowych i anty-bydlęcych, których sposób otrzymywania i widma precypitacyjne podano w poprzednim doniesieniu (5).

Immunoelektroforeza. Przeprowadzono mikrometodą według Scheideggera (4). Wyniki odczytywano po 48—72 godzinach.

Frakcjonowanie białek za pomocą riwanolu. Wykonywano wg metody Hořejsi (3). Do 1 objętości wodnego wyciągu z sera dodawano 3,5 obj. 0,4 % riwanolu. Po 1 godzinie wirowano przez 30 min. przy 3 tys. obr./min. Otrzymano 2 frakcje: osad (I) i płyn z nad osadu (Ia).

Osad (I) po 3-krotnym przemyciu roztworem soli fizjologicznej zadawano 1 obj. 10 % roztworem NaCl, odstawiano na 1 godz. poczym wirowano. Uzyskany płyn z nad osadu poddawano dializie wobec wody destylowanej (frakcja 1), a osad (II) zadawano 1 obj. 20 % NaCl i pozostawiano przez 12 godz. w temperaturze 4°,

a następnie odwirowywano przez 20 min. przy 2,5 tys. obr./min. Otrzymany osad (III) odrzucano, a płyn z nad osadu poddawano dializie wobec wody destylowanej (frakcja 2).

Płyn z nad osadu (Ia). Po zadaniu węglem aktywnym odstawiano na 12 godzin do chłodni, poczym węgiel odwirowywano a bezbarwny płyn (IIa) zadawano alkoholem etylowym (stężenie końcowe = 50 %) i po odstawieniu na noc do chłodni odwirowywano. Otrzymany osad suszono w próżni. Do badań zawieszano go w roztworze soli fizjologicznej (frakcja 3).

Otrzymywanie mukoproteidów. Dwie objętości wodnego wyciągu z sera gruźliczego zadawano 2,5 obj. 20 % kw. sulfosalicylowego na 20 min. Po odwirowaniu płyn z nad osadu zadawano 10 obj. alkoholu etylowego 96% i odstawiano na noc do chłodni. Powstały osad odwirowywano i suszono w próżni. Do badań zawieszano go w soli fizjologicznej.

Rozdział na kolumnach Sephadexu. Zastosowano Sephadex „Pharmacia” — Uppsala, G-25, G-50 i G-75. Wysokość kolumn 15 cm, $\phi = 15$ mm, ilość użytego Sephadexu wynosiła dla: G-25 = 3 g, G-50 = 2 g i G-75 = 1 g. Sephadex zawieszano w buforze fosforanowym 0,12 M. Sephadex umożliwia frakcjonowanie białek w zależności od ich drobiny (2). Roztwory wodne sera gruźliczego przepuszczano przez kolumny, używając 2 ml sera na każdą kolumnę. Wypływające frakcje zbierano w objętościach po 1 ml i oznaczano w nich białka metodą biuretową (1) w spektrofotometrze „Coleman” przy długości fali 550 m μ . Uzyskane frakcje badano w immunoelektroforezie wobec surowic odpornościowych antyserowych i antybydlęcych.

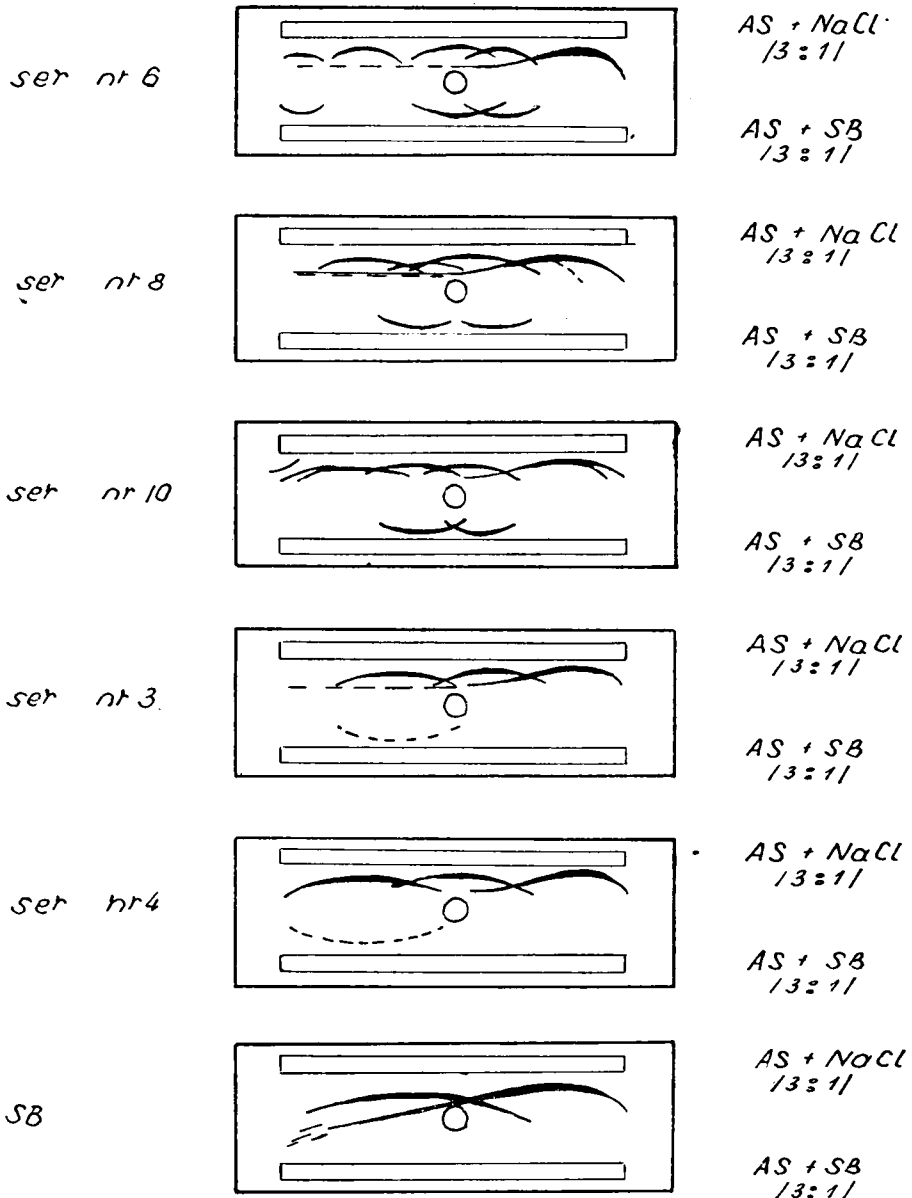
OBSERWACJE WŁASNE

Wodny wyciąg bydlęcego sera gruźliczego posiada złożoną budowę. Jego spektrum białkowe określone elektroforetycznie w agarze było podobne do obrazu surowicy bydlęcej. Wynik ten potwierdzono immunoelektroforezą, gdzie uzyskane widma sera z odpornościową surowicą anty-bydlęcą były zbliżone do widma surowicy bydlęcej. Podobny wynik uzyskano również metodą precypitacji w żelu.

Wyciągi wodne serów gruźliczych różnego pochodzenia poddano analizie immunoelektroforetycznej celem stwierdzenia, czy antygen swoisty dla sera (5) znajduje się w każdym gruźliczym serze bydlęcym. Ryc. 1 ilustruje otrzymane wyniki. Do wywołania widm użyto surowic: anty-serowej (AS), oraz anty-serowej wysyczonej surowicą bydlęcą (AS + AB). Przerzywana linia = ślad precypitacji.

Jak wynika z ryc. 1, w niektórych serach gruźliczych brak antygenów swoistych dla sera gruźliczego. Widoczne jest również, że antygen swoisty dla sera gruźliczego zachowuje się w polu elektrycznym jak α i β globuliny, natomiast antygeny gatunkowe umiejscowione są we frakcji odpowiadającej γ globulinom i albuminom.

Stosując riwanolową metodę Hořejsi otrzymano frakcje, które badano immunoelektroforezą. Były one stosunkowo czyste, gdyż dawały jedynie 2 prążki, z których jeden wykazywał ruchliwość w kierunku



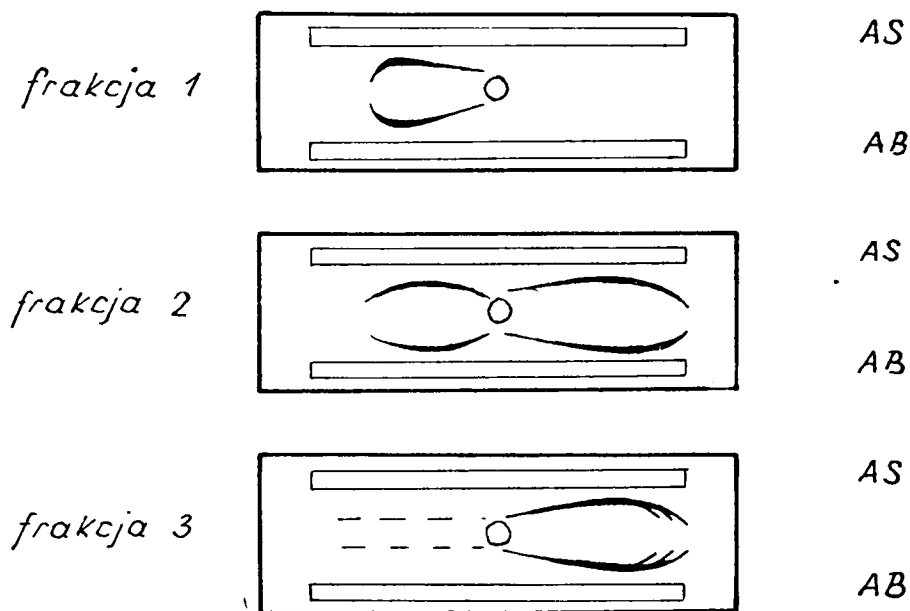
Ryc. 1. Immunoelektroforeza serów gruźliczych różnego pochodzenia;
linia przerywana — ślad precypitacji

Immunoelectrophoresis of caseous changes of different origin; interrupted line — trace of precipitation

anody, a drugi w kierunku katody. Dołączony immunoelektroforogram ilustruje uzyskany wynik (ryc. 2). Otrzymane frakcje nie wykazały cech

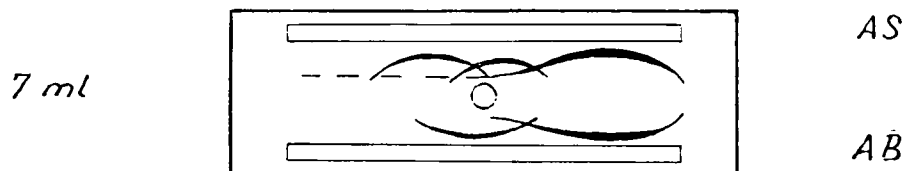
antygeny swoiste dla sera gruźliczego, dając identyczne widma z surowicą anty-serową i anty-bydłęcą.

Przez zastosowanie Sephadexów dążono do zróżnicowania poszczególnych frakcji sera na podstawie różnicy w wielkości drobin. Przy



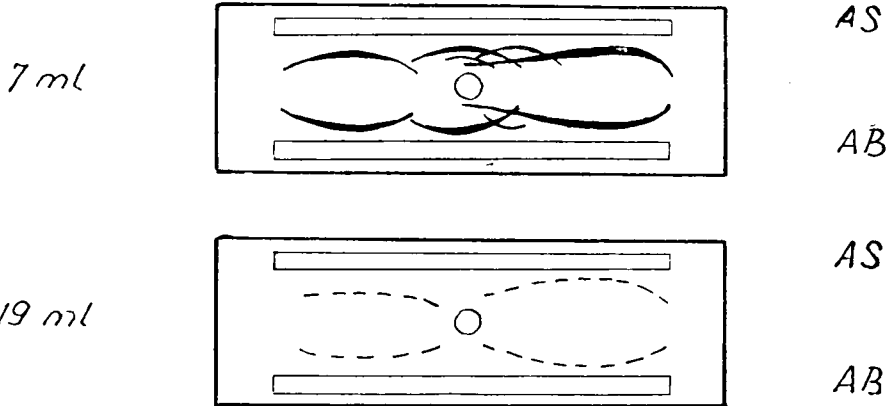
Ryc. 2. Immunoelktroforeza frakcji uzyskanych metodą Hofejsi z surowicami anty-bydłęcą (AB) i anty-serową (AS); linia przerywana — ślad precipitacji
 Immunoelctrophoresis of fractions obtained with the method of Hofejsi with anti-bovine (AB) and anti-caseous (AS) sera; interrupted line — trace of precipitation

pomocy Sephadexu G-50 i G-75 uzyskano rozdział sera na 2 frakcje, które badano immunoelktroforetycznie. Skład antygenowy otrzymanych frakcji ilustrują immunoelktroforogramy (ryc. 3, 4 i 5). Z rycin

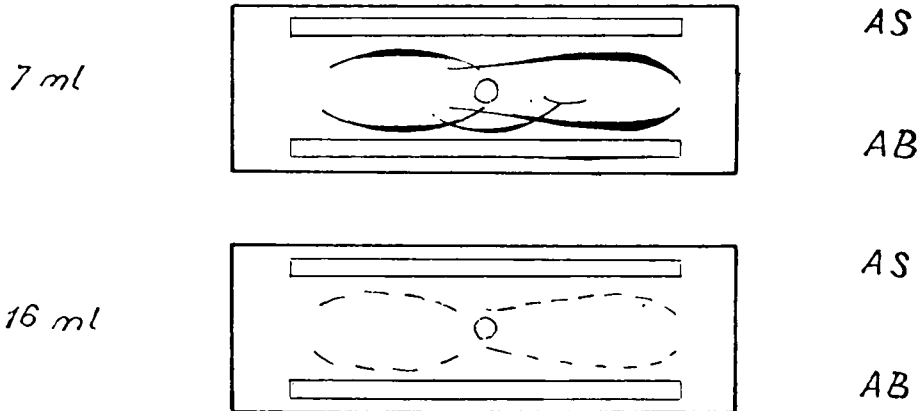


Ryc. 3. Widma immunoelktroforetyczne frakcji badanego wyciągu, otrzymanych po filtracji w żelu Sephadexowym G-25. Objaśnienia zob. ryc. 2
 Immunoelctrophoresis of a fraction of the analysed extract obtained after filtration in Sephadex G-25 gel. Explanation as in Fig. 2

widoczne jest, że nie udało się rozdzielić antygenów gatunkowych od antygenów swoistych dla sera za pomocą filtracji przez żele sephadexowe. Szybkość przepływu dla tych antygenów jest bardzo zbliżona lub identyczna.



Ryc. 4. Widma immunoelektroforetyczne frakcji badanego wyciągu, otrzymanego po filtracji w żelu Sephadexowym G-50
 Immunelectrophoresis of a fraction of the analysed extract obtained after filtration in Sephadex G-50 gel



Ryc. 5. Widma immunoelektroforetyczne frakcji badanego wyciągu, otrzymanych po filtracji w żelu Sephadexowym G-75
 Immunelectrophoresis of a fraction of the analysed extract obtained after filtration in Sephadex G-75 gel

Przeprowadzono również próbę wyodrębnienia antygeny serowo-swoistego od gatunkowego na drodze serologicznej. Mieszano surowice anty-bydłęce z wodnym wyciągiem sera w różnych stosunkach (stała ilość sera i wzrastające ilości surowicy anty-bydłęcej), pozostawiając

w temp. 37°C przez 90 min. a następnie w temp. 4°C przez 48 godz. Powstały precipitat odwirowywano, a płyn nad osadu nastawiano w odczynie precipitacji w żelu z surowicami anti-bydłęcą i anti-serową. W żadnej z wielu użytych kombinacji nie otrzymano wzbogacenia płynu w antygen serowo-swoisty. Mimo powstałego precipitatu w roztworze pozostawały zarówno antygeny serowo-swoiste jak i gatunkowe, a przy zwiększonej dawce surowicy anti-bydłęcej znikwały również antygeny serowo-swoiste. Wynika z tego, że nie da się tym sposobem wytrącić z roztworu antygenów gatunkowych bydłęcych, pozostawiając w roztworze antygeny serowe.

Precypitat oraz płyn nad osadu przepuszczano przez kolumny z Sephadexem, a wypływające frakcje 0,5 ml badano w immunoelektroforezie wobec surowicy anti-serowej i anti-bydłęcej. Była to próba mająca na celu oddzielenie antygenów serowo-swoistych od gatunkowych, przy wykorzystaniu różnic wielkości precipitatów w stosunku do niesprecypitowanych antygenów. Nie dała ona zachęcających wyników.

Ponieważ otrzymane opisanymi metodami frakcje albo nie wykazywały cech antygeny serowo-swoistego lub też występował on w nich wspólnie z antygenami gatunkowymi, przystąpiono do izolacji innych związków, posiadających charakter niebiałkowy. Przez odbiałczanie badanych wyciągów kwasem sulfosalicylowym i następnie działaniem alkoholem otrzymano mukoproteidy. Charakter mukoproteidalny stwierdzono polarograficznie oraz metodą barwienia wg Schiffa. Związki te okazały się serologicznie nieczynne. Roztwór wodny mukoproteidów nastawiony w odczynie precipitacji w żelu i immunoelektroforezy z surowicą anti-serową nie dał ani jednego prążka precipitacyjnego. Podobnie surowica anti-serowa, wysycona mukoproteidami w odczynie precipitacji w żelu i immunoelektroforezy z serem gruźliczym nie wykazała żadnych różnic w ilości i układzie prążków w stosunku do kontroli (kontrola = surowica anti-serowa nie wysycona).

Również lipidy okazały się serologicznie nieczynne. Alkoholowy ekstrakt wysuszonego sera (5) odparowywano, a osad emulgowano w adjuwancie Freuda. Szczepione taką emulsją króliki nie wytworzyły żadnych przeciwciał. Odpornościowe surowice anti-serowe, wysycane takim wyciągiem pozbawionym alkoholu w odczynie precipitacji w żelu nie wykazały żadnych różnic w stosunku do kontroli (5).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Jak wykazano w poprzednim doniesieniu (5), poglądy dotyczące niektórych badań immunologicznych w gruźlicy, a szczególnie problem antygenów martwiczych i przeciwciał anti-martwiczych należy poddać

rewizji. Wyciągi wodne z sera gruźliczego zawierają przede wszystkim antygeny gatunkowe. Są to silne, białkowe antygeny. Wśród nich potwierdziliśmy możliwość istnienia antyгену swoistego dla gruźliczego sera bydlęcego.

Próby mające na celu izolowanie z antyгену wyjściowego antyгену swoistego dla sera nie powiodły się. Wnioski, jakie z tego faktu można wysnuć, mogą — naszym zdaniem — być dwojakie: 1) albo antyген swoisty dla sera jest sprzężony z antygenem gatunkowym i trudno go uzyskać w formie czystej, albo 2) jest tak labilny, że zastosowana przez nas preparatyka była zbyt brutalna i unieczyniała go serologicznie. Hipotezę o ewentualnym sprzężeniu antyгенów popierają także wyniki doświadczeń z serologicznym oczyszczaniem wodnego wyciągu z gruźliczego sera bydlęcego.

PIŚMIENICTWO

1. Colowick S. P., Kaplan N. O.: *Methods in Enzymology*, Acad. Press. Inc. Publ., N. York 1957.
2. Flodin P.: *Chromatography*, 5, 103, 1961.
3. Hořejši P.: *Angew. Chemie*, 67, 21, 1955.
4. Scheidegger J. J.: *Int. Arch. All. Apl. Immunol.* 7, 103, 1955.
5. Scheller S., Dudziak Z.: *Arch. Immunol. i Ter. Dośw.*, 10, 447, 1962.

РЕЗЮМЕ

Целью исследования являлась характеристика антигенов, присутствующих в водном экстракте туберкулезного „cascum” и условия получения этих антигенов в чистом виде.

Доказано, что антиген, свойственный для скотского туберкулезного „cascum”, находится в белковой фракции (α и β глобулины).

Мукопротеиды и жировая фракция серологически не действовали.

Была попытка получить специфические, очищенные антигены — фильтрованием в „Сефадекс-гель”, путем серологической преципитации и фракционированием белка по методу Гожейши.

Отделить чистый, специфический антиген из скотского „cascum” не удалось.

Рис. 1. Иммуноэлектрофорез туберкулезного „cascum” различного происхождения. Прерванная линия — след преципитации.

Рис. 2. Иммуноэлектрофорез фракций, полученных по Гожейши с сыворотками; против-скотской (AB) и против-„cascum” (A.S.). Прерванная линия — след преципитации.

Рис. 3. Иммуноэлектрофорический спектр фракции экстракта, полученного после фильтрации в „Сефадекс-гель” Г-25. Объяснение рис. 2.

Рис. 4. Иммуноэлектрофорический спектр фракции экстракта, полученного после фильтрации в „Сефадекс-гель” Г-50.

Рис. 5. Иммуноэлектрофорический спектр фракции экстракта, полученного после фильтрации в „Сефадекс-гель” Г-75.

SUMMARY

In this study trials were made to describe antigens present in aqueous extract from bovine caseous changes and to obtain the antigens in pure form.

The authors demonstrated that antigens characteristic of tuberculous changes are in the protein fraction (α and β globulins).

The mucoproteins and the lipid fractions were serological inactive.

Trials were made to obtain specific antigens by filtration in the Sephadex-gel, by serological precipitation and by the Hořejsi method. The trials were negative.

Pracę otrzymano 15 XII 1963.