

Из кафедры Ветсанэкспертизы, Зав. доц. Горегляд Х. С.

ТЕХНИКА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕЦИПИТИНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ВИДА МЯСА.

Х. С. Горегляд.

Идея получения преципитирующей сыворотки для определения белков различных видов животных не новая. Краус (Kraus) впервые это доказал на противотифозной сыворотке при смешении ее с прозрачным фильтратом тифозных культур, наблюдая при этом появление мути и выпадения осадка—преципитита. Чистович и Бордэ (Bardet) доказали это свойство сыворотки, полученной ими путем гипериммунизации кроликов под кожу сывороткой лошади, кровью угря, кровью курицы и молоком. Они получили сыворотку, обладавшую преципитирующими свойствами в соответствующих больших разведениях с белком того вида животных, сывороткой или молоком которых гипериммунизировался кролик.

Открытие в крови животных этого феномена—вырабатывать специфические преципитины (коагулины) против белковых веществ—имело большое научное и практическое значение, благодаря ему были получены преципитины обработкой кроликов растительными белками „фитопреципитины“ и животными белками „зоопреципитины“.

Уленгут и Вассерман (Uhlenhuth и Wassermann) получили преципитины против белков различных животных, что дало возможность применять их в судебно-медицинских экспертизах для определения природы судебно-следственного материала (пятен крови, спермы, мяса, молока и т. д.) оказавшегося на людях, подозреваемых в убийстве, краже, хищении, убое животных и т. п. преступлениях.

Преципитин в судебно-медицинских лабораториях в Западной Европе имеет большое применение. Применяется он и у нас в судебно-медицинских лабораториях. В ветеринарной практике преципитин для определения того или иного вида белка животных, несмотря на большой спрос, не получил распространения, тем не менее этот ингредиент заслуживает большого внимания и в работе ветеринарных лабораторий.

Одним из весьма существенных моментов в изготовлении преципитина—это получение преципитиногена.

По Шютцу (Schütz) преципитиноген готовится следующим образом: 400 грамм мышечной ткани, механически очищенной от жира и фасций, измельчают на мясорубке и варят 30 минут в одном литре воды. Сваренное мясо декантируют, бульон сливают, а остаток отжимают. Отжатый коагулят белков заливают 500 кубиками кипящего 1 процентного водного раствора едкого натра и кипятят 5 минут. Нерастворившийся осадок отделяют и осаждают 5 процентным раствором уксусной кислоты, избегая при этом избытка последней. Коагулят белка декантируют, отфильтровывают, промывают дистиллированной водой и влажным растирают в ступке с прибавлением 90° этилового спирта. Потом спирт сливают, промывают коагулят эфиром и высушивают. Полученный порошок белка—преципитиноген—разводят в соотношении 2 : 10—1 процентным водным раствором соды и вводят кролику по 10—15кс каждые 2—3 дня, в начале интравенозно, а потом интраперитонеально.

По Шмидту (Schmidt)—60 куб. см. кровяной сыворотки собаки, лошади, быка или другого вида животного смешивают с равным объемом физиологического раствора поваренной соли и нагревают при 70° С на водяной бане в продолжении 30 минут. Потом добавляют 10 куб. см. нормального раствора едкого натра и снова подогревают 15 минут, благодаря чему образовавшийся вначале коагулят белка получается жидким и прозрачным. Полученный таким образом преципитиноген вводят кролику интраперитонеально по 20 куб. см. через каждые 4 дня на протяжении 30 - 40 дней.

Фудживара (Fudliwara) обрабатывал сыворотку крови определенного вида животного таким путем: 10 куб. см. сыворотки разводил в 10 кратном объеме дистиллированной воды, потом добавлял 20 куб. см. концентрированного раствора поваренной соли, 6—10 капель 5 процентной уксусной кислоты и подогревал на кипящей водяной бане. Белок сворачивался, после чего декантировался, отфильтровывался и осадок для дальнейшего сохранения его заливался толуолом. Полученный коагулят белка—преципитиноген—он разводил 1 : 10 в физиологическом растворе и вводил кроликам интраперитонеально по 2—10 куб. см. с перерывами в 2—4 дня, доводя до 4—6 инъекций. Форнет и Мюллер (Fornet и Müller) рекомендуют пользоваться в качестве преципитиногена кровяной сывороткой соответствующего вида животного, вводить ее кролику через каждые 24 часа до 4—5 инъекций под кожу, постепенно увеличивая дозу, доведя последнюю до десятикратного увеличения начальной дозы.

Каждый из этих методов имеет свои положительные и отрицательные стороны. Положительные, например, в методиках Шютца, Шмидта и Фудживара это то, что при такой обработке преципитиногена удается подготовить белок к наилучшему восприятию его организмом, в который он вводится паренте-

рально, хотя такая обработка белка очень сложная и кропотливая. Отрицательным з этих методах—это длительная иммунизация—30—40 дней ввиду чего неизбежны случаи анафилактики, часто протекающей смертельным исходом для гипериммунизируемых животных. Пользование преципитиногенем в виде водных экстрактов мяса или сыворотки крови (Форнет и Мюллер) не всегда дает хороший эффект образования преципитинов, очевидно потому, что необработанный химически или термически белок с последующим механическим измельчением (растиранием), введенный в организм кролика парентерально, или не обладает достаточной активностью, как преципитиноген, или же претерпевает такие биохимические изменения в организме, которые понижают преципитиногенные свойства его. Затяжность гипериммунизации кроликов, вызванная замедлением образования преципитина, требует еще одной или двух инъекций сверх 4—5, что вызывает повышенную чувствительность организма к чужеродному белку. Обычно последняя (6—7-я) инъекция совпадает на 12-й и 14-й день со дня начала гипериммунизации, в результате чего очень часто опыт заканчивается анафилактикой и преждевременной смертью кролика.

Вот те обстоятельства, которые осложняют и ведут к неудачам при получении преципитирующей сыворотки.

Проработав ряд лет (1925—35 гг) по изготовлению преципитина для определения происхождения вида мяса, мы пользовались своей методикой, которая отличается от методов, описанных в руководствах Тарасевича, Златогорова, Углова и др. В условиях практической ветеринарной действительности часто приходится определять природу происхождения мяса и мясных изделий. Отсутствие массового применения преципитирующей сыворотки для идентификации белков разных животных является следствием сложности изготовления ее и теми неудачами которые обычно при этом наблюдаются.

Техника изготовления преципитина, которой мы пользовались, заключается в следующем:

Изготовление — преципитиногена. 100 гр. мышечной ткани, механически освобожденной от жира и фасций, измельчается на мясорубке, помещается в колбу и заливается 200 куб. см. дистиллированной воды, выдерживается в прохладном месте 24 часа; а потом коагулируем белки кипячением на водяной бане при температуре кипения воды в течение 30—40 минут, после чего декантируем и фильтруем. Отжатый осадок растираем с прокаленным песком в стерильной ступке. Растертый осадок разводим 1:5 физиологическим раствором. Таким образом, преципитин готов для опыта. При необходимости хранения его, консервировали прибавлением 0,25 проц. фенола.

Изготовление приципитина. Для опыта брались кролики весом не менее 600 грамм. Перед опытом за кроликами установ-

дивалось 3 х дневное наблюдение и при нормальном поведении кроликов приступали к гипериммунизации. В начале кролику вводили интраперитонеально 5 куб. см преципитиногена, через 48 часов—10 куб. см., через вторые 48 часов—15 куб. см. и через 48 часов после третьей инъекции—20 куб. см., из которых 10 куб. см. интраперитонеально и 10 куб. см. субкутанно. Перед инъекцией приципитиноген подогревался на водяной бане до 1° тела животного. Во избежании анафилаксии при 3-ей и 4-й инъекции, перед введением назначенной дозы инъецировалось 0,1—0,2 куб. см. преципитиногена под кожу и через 5—8 м. вводилась назначенная доза полностью. Несмотря на предпринятую предосторожность все же наблюдались случаи анафилактического шока, проявившиеся спустя 2—3 минуты после инъекции в виде полупаралича зада. Кролик при этом вытягивает голову и ноги, тяжело дышит и лежит вытянувшись. Через 40 минут—1 час признаки анафилаксии проходят, животное поднимается на ноги и свободно передвигается. Через 3—4 часа приступает к приему корма, правда неохотно, что обычно и наблюдается до конца опыта. На 7—8-ой день после 4-ой инъекции, кролик обескровливается путем отсепарировки и перерезки *arteria carotis*. Кровь собиралась в узкие цилиндры, 6—8 час., выдерживалась в термостате и потом переносилась в прохладное место. Через 24 часа сыворотка отсасывалась и разливалась в мелкие флакончики или ампулы лучше, конечно, оранжевого стекла и консервировалась 2-мя каплями хлороформа на 10 куб. см. сыворотки. Титр сыворотки устанавливался до консервирования. Пользуясь описанной техникой изготовления преципитиногена и преципитата, мы получали сыроворотку титра не ниже 1 : 10000 с соответствующими испытуемыми экстрактами, считая за положительную реакцию появление преципитата не позже 3—5 минут при одновременной постановке контроля с нормальной сывороткой кролика, которая обычно давала кольцо в разведении 1 : 100 и ниже

Выводы: 1. Рекомендуемая нами техника изготовления преципитирующей сыроворотки несложная и обеспечивает получение преципитина титра 1 : 10000 и выше, вполне отвечающего требованиям реакции преципитации.

2. Приготовление преципитирующей сыроворотки для установления происхождения вида мяса (от какого животного) необходимо ввести в ветеринарную практику более широко чем это имеет место в настоящее время и на что часто предъявляются требования со стороны следственных и судебных органов.

Л и т е р а т у р а

1. Златогоров С. П. — Учение о микроорганизмах. Ч. Ш. 1918 г
2. Мечников и Тарасевич — Основы микробиологии. 1912 г.
3. Рево — Основы микробиологии. (Укр. изд.) 1929 г.
4. Хлопня и Углов — Методы исследования мяса, мясных и других продуктов. 1934 г.
5. Herman — Die Präcipitine und die Methoden Präcipitacion. (Handbuch den biogologischen Arbeitsmethoden E. M. Abderhalden—1921 г.)
6. Rosenberg R. — Eine Methode der präcipitatorischen Eiweissdifferencierung von stark gekoeten Fleisch (Zentralblatt Bact. Parasit. Und Infectionskrankh. B-d. 107, 1928 г.)

Doc. Goregljad Ch.

**„Technik der Erhaltung von Precipitin für Fleisch
bestimmung“**

(Lehrkancel für Nahrungsmittelkunde)

Die Methoden von Schütz, Smidt, Fudjiwara werden einer kritischen Betrachtung unterworfen (lange Zeit dauer und mögliche Anaphylaxie). Es wird eine eigene Methode vorgeschlagen — Extraction von 100,0 Fleisch mit 200,0 Wasser 24 Stunden in der Kälte. Danach Koagulation des extrahierten Eiweisses im Wasserbad 30-40 Minuten; dekantieren und Filtration. Das Eiweissprecipitat wird mit sterilem Quarzsande zerrieben und danach mit 5 facher Menge Sol. Natr. Chlorati 0,8 % gelöst. Bei Aufbewahrung—konserwieren mit 0,25 % Phenol. Anwendung bei Kaninchen intraperitoneal 5,0, nach 48 Stunden 10,0 U. S. W. bis 20,0 danach wieder 10,0 und zuletzt 10,0 Subcutan. Nach 7-8 Tagen Blutentnahme. Titr des Precipitin 1 : 10000.