

Из кафедры микробиологии

И. о. зав. кафедрой доцент, кандидат ветеринарных наук **Б. С. Сухорецкий**

ЗАВИСИМОСТЬ РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИГЕНА В ЭКСТРАКТЕ

Доцент Б. С. СУХОРЕЦКИЙ

Реакция преципитации в практическом ее применении для обнаружения сибиреязвенного антигена в кожевенно-меховом сырье и в трупном материале, а также для диагностики других инфекций у сельскохозяйственных животных считается достаточно точным, специфическим и весьма доступным для производства методом исследования, проверенным практикой жизни на протяжении более чем 50 лет.

Однако считать р. преципитации совершенным методом исследования нельзя; она имеет ряд существенных недостатков.

Детали, уточнявшие технику постановки реакции преципитации при сибирской язве, т. е. при инфекции, при которой она имеет наибольшее значение, разрабатывались многочисленными исследователями, но эти исследования мало изменили основные условия, при которых она ставится в производстве.

При диагностике сибиреязвенной инфекции в соответствии с инструкцией реакция ставится с экстрактами из кожевенно-мехового сырья или трупного материала и наблюдается в течение первых 15 минут.

Все случаи наступления видимых реакций после 15 минут оцениваются как неспецифические и отрицательные. При этом не принимается во внимание то, что экстракты могут иметь небольшую, слабую концентрацию антигена и преципитация с ними будет наступать значительно позднее. Специалисты, работающие в лабораториях Асколи, хорошо знают, что определенный процент проб от кожевенно-мехового сырья дает положительную или сомнительную реакцию преципитации позднее установленного инструкцией срока.

Обычно в таких случаях ограничиваются повторным исследованием экстрактов от данных проб. Получение при вторичной постановке реакции отрицательного результата через 15 минут после соединения компонентов дает право ставить отрицательный диагноз на сибирскую язву. Иногда такие запоздалые реакции совпадают со случаями взятия проб от кож животных, вынужденно забитых на мясо, с исследованиями туш мяса и с другими моментами, связанными с не вполне развившейся септицемией, а следовательно, недостаточным насыщением тканей животного специфическим антигеном. Эти случаи следует расценивать, как совершенно естественное явление.

При оптимальных внешних условиях (температура, концентрация водородных ионов и электролитов и др.) и при оптимальных количествах основных компонентов, реакция антигена с антителами по старым данным Драйера и Дугласа (1910) и Кромвеля (1923) заканчивается в тече-

ние 15—30 минут. Этот срок является твердо установленным, не вызывал сомнения и был, вероятно, принят во внимание при определении срока наблюдения за реакцией преципитации в производственных условиях при исследованиях на сибирскую язву.

По новым данным Медведевой Т. И. (1949), полученным с применением новейшей техники исследования — термофотоэлектрометрии, весь процесс реакции преципитации от момента образования авизуальной мути до полного выпадения видимого невооруженным глазом преципитата заканчивается в течение 1—2 час. Совершенно естественно, что при нарушении оптимальных условий и соотношения компонентов, например, при уменьшении количества антигена реакция будет замедляться.

Ряд литературных данных указывает на наличие несомненной и прямой зависимости, существующей между временем наступления преципитации и количеством антигена, участвующего в реакции.

Катагощин А. В. (1914), при разработке методов обнаружения конины в колбасах, серолигическими реакциями установил, что чем меньше количество конины входит в мясную смесь (колбасы), тем позднее во времени наступает реакция преципитации с «антиконской» преципитирующей сывороткой.

Левитов Н. Н. (1931) при изучении вопроса о возможности использования реакции преципитации для прижизненной диагностики сибирской язвы у животных нашел, что при малом количестве преципитиногена в экстракте реакция преципитации не происходит.

Никифорова Н. М. и Коппа Э. К. (1935) отмечают, что экстракты из кож животных, павших от сибирской язвы, бывают различны по своей активности, очевидно, в зависимости от различного содержания в них сибиреязвенных бацилл и их продуктов, поэтому они дают преципитацию в различные сроки. Наряду с этим, авторы считают, что результаты реакции во времени зависят также от активности преципитирующей сыворотки.

Гейдельбергер, Кендаль и др. (1930) при изучении механизма серологических реакций обнаружили, что количество преципитата, образующегося в реакции, а следовательно, и внешнее проявление последней зависит от количества присутствующего в экстракте антигена и от количества антител в сыворотке. При увеличении антигена, количество преципитата увеличивается до максимума, а затем, вследствие наступления зоны задержки, начинает падать.

Гукер, Бойд и Смолуковский (1935), установили, что существует линейная зависимость между скоростью наступления реакции преципитации и концентрацией антигена в экстракте. Концентрацию антигена в испытуемой пробе можно установить по кривой времени наступления реакции, построенной на основании определений времени преципитации заведомо известных доз антигена.

Бернгоф Ф. Г. (1946) при разработке метода диагностики туляремии путем испытания бактериального гаптена в реакции преципитации нашел, что реакция наступает тем скорее и отчетливее, чем концентрированнее антиген. При недостаточной концентрации активного вещества в антигене (экстракте) даже при очень сильной антисыворотке преципитация развивается медленно и результат реакции может быть неотчетливым.

Приведенные рассуждения, личные наблюдения и литературные данные явились основанием для организации специальных исследований.

Целью своих исследований мы определили выяснение вопроса о зависимости времени наступления реакции преципитации от концентрации сибиреязвенного антигена в экстракте и о возможном влиянии этого явления на показания реакции в производственных условиях.

Имея в своем распоряжении несколько проб от заведомо-положитель-

ных на сибирскую язву кож животных (стерилизованные и высушенные) и специфический бактериальный полисахарид, извлеченный из культур возбудителя сибирской язвы по методу Пошона, мы решили испытать указанные вещества в реакции преципитации, взяв их в различных разведениях, т. е. искусственно создав экстракты с различными концентрациями антигена в них.

Экстракты для реакции готовились путем извлечения преципитиногена карболизированным физраствором в течение 24 часов из стерилизованных и измельченных проб кож, заведомо положительных по сибирской язве, взятых в соотношении 1 : 10, с последующей фильтрацией через асбест до полной прозрачности. Специфический полисахарид получался по методу Пошона, путем экстракции культур бацилл антракса трихлоруксусной кислотой, осаждения алкоголем, очищения посредством двукратного растворения в дистиллированной воде, с последующим каждый раз осаждением спиртом и высушиванием при 38—40°.

Вторым компонентом являлись преципитирующие противосибирезвенные сыворотки: производственная, серии № 181, изготовленная Тобольской биофабрикой и экспериментальные, полученные нами, путем гипереммунизации вакцинированных кроликов культурами стандартного сибирезвенного вируса № 49 (соматический антиген), консервированные карболовой кислотой (0,5%).

Реакция преципитации ставилась по общепринятой методике в специальных преципитационных пробирках, путем наслаивания на сыворотку чистого или разведенного физраствором хлористого натрия экстракта, извлеченного из кож или специфического полисахарида. Для наслаивания употреблялись стеклянные пипетки. Компоненты реакции соединялись в одинаковых объемах по 0,3—0,4 мл.

Реакция производилась при комнатной температуре и просматривалась через каждые 1—2 минуты. Полисахарид сибирезвенного бацилла разводился начиная с 1 : 500 или 1 : 1000, т. к. растворы с большей концентрацией препарата, как правило, подвергались желатинизации. Положительной реакцией считалось появление отчетливо выраженного серо-белого кольца или диска на границе соприкосновения экстракта-полисахарида с сывороткой. Всего было поставлено 10 опытов, результаты которых представлены в таблицах 1 и 2.

Т а б л и ц а 1

Результаты постановки реакции преципитации с экстрактами, содержащими сибирезвенный антиген в различных количествах

Разведения экстрактов	Опыт № 1 экстракт кожи № 1	Опыт № 2 экстракт кожи № 2	Опыт № 3 экстракт кожи № 3	Опыт № 4 экстракт кожи № 4	Опыт № 5 стандартный сибирезвен. антиген сер. № 74	Опыт № 6 экстракт из бактерии ага- ровой культуры № 43
-----------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	--	--

Противосибирезвенная, преципитирующая сыворотка, серии № 181

Чистый	Преципитация наступала в (минутах) через:					
	40"	1'	1'	30"	20"	40"
1 : 1	1'	2'	2'	1'	30"	1'
1 : 2	3'	7'	16'	10'	2'	1'
1 : 5	8'	43'	30'	14'	4'	1'30"
1 : 10	14'	58'	37'	35'	5'	2
1 : 20	60' (слабо)	65' (слабо)	49' (слабо)	45'	40'	9'
1 : 50	90' (очень слабо)	115 (очень слабо)	75 (очень слабо)	—	69' (слабо)	35'

Из таблиц демонстративно выступает зависимость времени наступления реакции преципитации от концентрации антигена в растворе: чем больше разведен экстракт из кожи или специфический полисахарид, тем медленнее наступает видимая реакция. Одновременно с этим мы констатировали изменения качественных показателей положительной реакции, выражающихся в образовании все более слабого, тонкого и медленно появляющегося кольца—диска на границе соприкосновения жидкостей в зависимости от уменьшения концентрации антигена. Эти явления следует иметь в виду в практической работе, в особенности при учете приведенных выше новых данных Медведевой Т. И. о сроках окончания реакции преципитации.

Т а б л и ц а 2

Результаты постановки реакции преципитации с полисахаридом, извлеченным из культур бацилл антракса

Разведения антигена-полисахарида	Антиген—полисахарид, извлеченный из культур сибиреязвенного бацилла путем экстракции трихлоруксусной кислотой по методу Пошона			
	Опыт № 7 Преципитирующая сыворотка от кролика № 5	Опыт № 8 Преципитирующая сыворотка от кролика № 6	Опыт № 9 Преципитирующая сыворотка от кролика № 7	Опыт № 10 Преципитирующая сыворотка от кролика № 8
1 : 1000	до 1'	до 1'	до 1'	до 1'
1 : 10000	5'	5'	5'	5'
1 : 15000	10'	10'	10'	10'
1 : 25000	10'	20'	50'	40'
1 : 30000	41'	—	60'	(90' слабо)
1 : 40000	—	—	—	—

- П р и м е ч а н и е. 1. опыты ставились в разное время.
2. Полисахариды, примененные в опытах № 7—8 и № 9—10, были различных серий.

В ветеринарной практике наблюдаются нередкие случаи сибиреязвенной инфекции у животных, протекающие атипично, а также случаи, при которых процесс септицемии почему-либо не развивается (вынужденный забой животных, смешанные инфекции, индивидуальные особенности в состоянии организма и пр.). Естественно при этом, что обсеменение организма бациллами антракса происходит в небольшой степени.

Следует предположить, что при указанных случаях материалы, поступающие для исследования (кожи, овчины, мясо, патолого-анатомический материал и пр.), будут содержать небольшие количества антигена, а следовательно, при экстракции будут получаться слабые компоненты, с которыми видимая невооруженным глазом реакция преципитации будет наступать медленно и поздно. Это особенно касается мокросоленого кожевенного сырья, из которого антиген может частично удаляться до исследования.

Подобные случаи могут оставаться невыявленными при массовых исследованиях материалов на сибирскую язву в лабораториях и кожи, овчины и проч. будут неограниченно использованы, хотя они и происходят от животных, болевших сибирской язвой.

О появлении поздно наступающих реакций в небольшом проценте, определяемых как сомнительные, а чаще как «неспецифические» при массовой асколизации кожевенно-мехового сырья в лабораториях, сообщают многие практические работники. В лучшем случае такие пробы исследуются повторно, но при тех же условиях, что и в первый раз.

Мы считаем, что при повторном исследовании по реакции преципитации проб от кожевенно-мехового сырья и др. материалов, дающих сом-

нительные реакции, в особенности поздно наступающие, иногда определяемые как «неспецифические», следует готовить более концентрированные экстракты, исходя, например, из соотношения пробы и физраствора 1 : 5, не допуская при этом желатинизации растворов.

Совершенно необходимо при этом увеличить время наблюдения за ходом реакции до 30 минут. Удлинение срока наблюдения за реакцией преципитации не вызовет больших затруднений и осложнений в работе лаборатории Асколи и при правильной организации производственного процесса не отразится на ее пропускной способности.

На основании данных нашего исследования представляется возможным сделать следующие выводы:

1. Быстрота наступления реакции преципитации и ее качество при исследовании материалов на сибирскую язву находятся в прямой зависимости от концентрации антигена (специфического полисахарида) в экстракте.

2. Срок наблюдения в течение 10—15 минут за реакцией преципитации в производственных условиях, определенный инструкцией, недостаточен. Необходимо его увеличить не менее чем до 30 минут.

3. При повторной асколизации сомнительных проб от кожевенно-мехового сырья и от других материалов, дающих запоздалые реакции, следует насколько это возможно (без желатинизации) готовить более концентрированные экстракты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архив ветеринарных наук, 1914.
2. Журнал «Вет. специалист на социалистической стройке», № 11, 1931.
3. Казанский медицинский журнал, № 6, 1940.
4. Журнал «Сов. медицина», № 5—6, 1940.
5. Журнал «Микроб. эпид. и иммун.», № 7, 1946
6. Кузин А. М. «Химия и биохимия патогенных микробов», 1946.
7. Зильбер А. А. «Основы иммунитета», 1948.
8. Бойд В. «Основы иммунологии», 1949.
9. Труды Ташкентского мединститута, № 2/10, 1949.
10. Ученые записки Витебского ветеринарного института, т. XI, 1952.