

BADANIA NAD GRUPAMI KRWI U NOREK

Wiesława Krupińska, Jan Rapacz, Anna Kazana

Instytut Zootechniki, Zakład Immunogenetyki

Kierownik: prof. dr Jan Rapacz

WSTĘP

Studia nad grupami krwi u różnych gatunków zwierząt domowych trwają już ponad dwadzieścia lat. Najdokładniej poznano zróżnicowanie serologiczne czerwonych komórek krwi bydła. Fakt, że antygeny krwinkowe występujące na powierzchni czerwonych krwinek dziedziczą się w prosty sposób, nie ulegają zmianie w ciągu całego życia danego osobnika, warunkowane są przez geny oraz że dają się rozróżnić przy pomocy stosunkowo prostych odczynów serologicznych, zdecydował o ich największej przydatności do badań nad genetycznymi właściwościami osobników, ras i populacji. Ponadto badania grup krwi mają na celu wyjaśnienie pewnych zjawisk genetycznych; mają też praktyczne zastosowanie w hodowli zwierząt.

Stosunkowo niedawno rozpoczęto prace nad grupami krwi u norek. Niezbyt duża popularność tego gatunku przez długi okres czasu nie stwarzała konieczności prowadzenia takich badań. Poza tym norki ze względu na wysoką wartość rynkową oraz trudności związane z chowem i hodowlą, stanowią specyficzny materiał doświadczalny. Pierwsze prace nad grupami krwi u norek ukazały się w 1962 r. opublikowane przez Rapacza i Shackelforda (4).

Celem niniejszej pracy było rozpoczęcie badań immunogenetycznych nad norkami w Polsce poprzez produkcję surowic odpornościowych.

MATERIAŁ

Prace prowadzono na norkach odmiany standard na fermie Instytutu Zootechniki w Zakładzie Doświadczalnym Chorzelów. Stado podstawowe stanowiło 41 norek (20 samców i 21 samic). Ogółem przebadano 261 szt. zwierząt. Do szczepień użyto 7 kóz i 18 królików.

METODYKA

Surowice odpornościowe uzyskiwano drogą izoimmunizacji nerek oraz heteroimmunizacji kóz i królików. Szczepienia przeprowadzano co cztery dni. Od nerek dawców przez punkcję serca pobierano krew do płynu konserwującego (28 g cytrynianu sodu + 4 g chlorku sodu + 0,5 g streptomycyny — na 1 litr wody destylowanej) i następnie wstrzykiwano roztwór w ilości 2 ml biorcom — norkom i królikom oraz 4 ml kozom. Po pięciu domięśniowych iniekcjach od biorców pobierano większe ilości krwi (10 ml od nerek, 20 ml od królików i 100 ml od kóz). Odwirowaną surowicę inaktywowano, w celu wytrącenia włóknika przez 30 min. w temp. 56°C, a następnie przechowywano w -20°C. Miano powstałych przeciwciał (aglutynin) badano testem aglutynacyjnym w następujący sposób: do probówek zawierających 2 krople surowicy w różnych rozcieńczeniach wprowadzano po 1 kropli 2,5-procentowej zawiesiny przemytych trzykrotnie płynem fizjologicznym krwinek norczych. Probówki wytrząsano i pozostawiano na 45 min. w temp. 37°C. Następnie odwirowywano przez 1 min. przy obrotach 1500/min. i zapisywano wyniki wg pięciostopniowej skali; zupełna aglutynacja + + + +, niższe reakcje + + +, + +, + i ±. W przypadku otrzymania słabych wyników lub przy zupełnym ich braku, po upływie trzech miesięcy przeprowadzano reimmunizację.

Surowice otrzymane drogą heteroimmunizacji absorbowano w celu usunięcia powstałych niepożądanych przeciwciał obcogatunkowych. Również metodą absorpcji dokonywano rozdziału surowic poliwalentnych. Do absorpcji używano trzykrotnie przemytych krwinek norczych. Czas i liczbę absorpcji ustalono dla każdej surowicy w zależności od miana jej przeciwciał oraz zdolności absorpcyjnej krwinek. Krew do absorpcji zalaną płynem konserwującym przetrzymywano w 4°C w lodówce. W takich warunkach nadawała się ona do użycia przez 2 do 3 dni.

WYNIKI

Wyniki immunizacji ujęte są w tab. 1.

Na 66 szczepionych nerek tylko 19 biorców odpowiedziało wytworzeniem przeciwciał na wprowadzenie antygeny dawcy. Trzy surowice straciły aktywność zanim zdołano ustalić jakiego typu przeciwciała zawierają. Trzy norki wytworzyły przeciwciała dla antygeny B_1 , lecz po kilku miesiącach surowice te straciły aktywność. Dwie surowice zawierały przeciwciała anty- A oraz trzy przeciwciała anty- B_2 . Wszystkie surowice norcze, z wyjątkiem jednej anty- B_1 i jednej anty- A , były monowalentne, a miano przeciwciał wahało się w granicach od 1/2—1/8. Trzy surowice uzyskane w ostatniej serii szczepień nie zostały jeszcze poddane dokładnej analizie. Bardzo duża liczba upadków nerek oraz konieczność uboju

sztuk wybrakowanych spowodowała, że tylko 17 zwierząt mogło być reimmunizowanych.

Początkowo do izoimmunizacji dobierano pary o nieznanym składzie antygenowym jedynie na podstawie reakcji z absorbowanymi surowicami króliczymi lub na podstawie pokrewieństwa (matka — córka). Dopiero w miarę otrzymywania monowalentnych surowic ustalono szczepienia tak, aby dawca od biorcy różnił się posiadaniem znanej cechy antygenowej lub tak, aby obydwaj osobniki ją miały (eliminacja możliwości otrzymania posiadanej już antysurowicy).

Tabela 1

Wyniki uodpornienia nerek, królików i kóz przeciw antygenom krwinkowym nerek

Gatunki zwierząt użyte do immunizacji (biorcy)	Liczba szt. immunizowanych	Liczba szt. reagujących	Miano uzyskanej surowicy	Stwierdzone przeciwciała	Miano surowicy testowej
Norki	66	19	1/2—1/16	A, B, B ₂	1/2—1/8
Króliki	18	15	1/500—1/1500	A, B, B ₂	org. — 1/4
Kozy	7	7	1/100—1/500	A, B, C	1/2

W przypadku heteroimmunizacji kóz i królików wszyscy biorcy, z wyjątkiem trzech młodych królików, wytworzyli przeciwciała o bardzo wysokim mianie, które utrzymywało się w ich organizmie do pół roku. Surowice heteroodpornościowe reagowały z surowicą wszystkich nerek i dlatego najpierw należało drogą absorpcji usunąć przeciwciała obcogatunkowe. Ponadto każda z tych surowic zawierała po kilka typów przeciwciał, nie wszystkie jednak dały się wyodrębnić.

Cztery otrzymane monowalentne surowice testowe anty-A, anty-B, anty-B₂ i anty-C porównywane były z surowicami otrzymanymi od Rapacza z Uniwersytetu Wisconsin w 1967 r.

Antygeny, dla których otrzymano przeciwciała należą do jednego układu A i warunkowane są przez trzy geny allelomorficzne: A^a, A^b, A^c (3, 5). Po przebadaniu 261 nerek ustalono sześć fenotypów, które spotykano u wszystkich tych zwierząt:

A, AB(B₂), AC(B₂), B(B₂), BC(B₂), C(B₂).

Dziedziczenie antygenów krwinkowych układu A u nerek przedstawia tab. 2.

Tabela 2

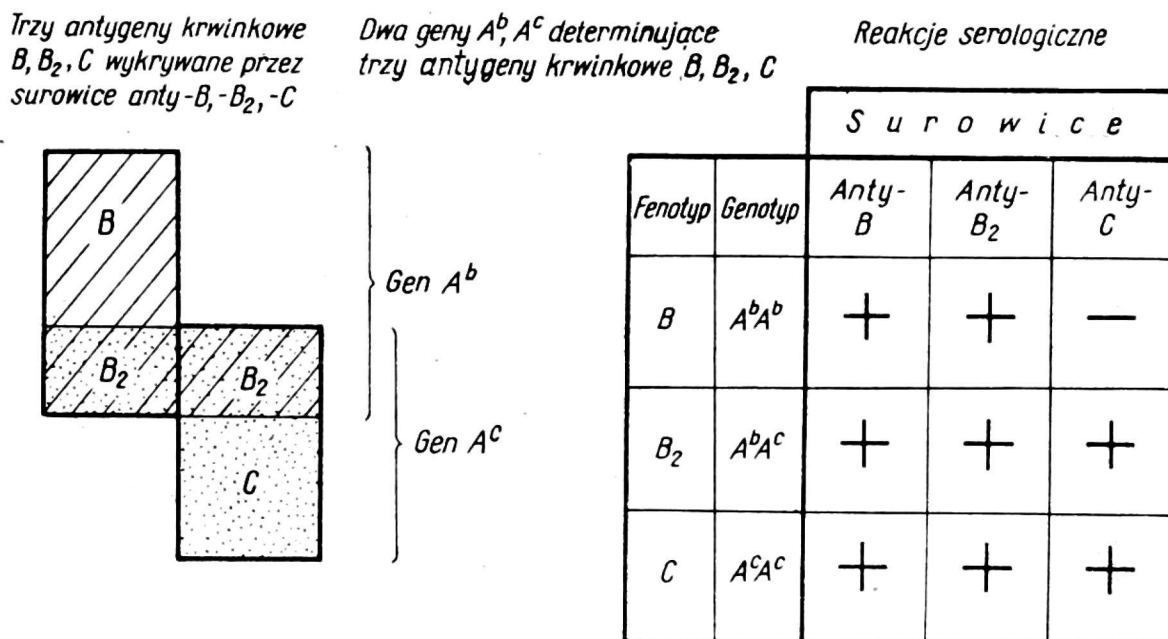
Dziedziczenie antygenów krwinkowych w układzie A u nerek

Liczba par	Typ kojarzeń		Potomstwo			
	fenotypy	genotypy	liczba	sztuk	fenotypy	genotypy
4	$A \times AB$	$A^aA^a \times A^aAb$	14	5	AB	A^aAb
				9	A	A^aA^a
1	$A \times C$	$A^aA^a \times A^cA^c$	1	1	AC	A^aA^c
3	$AB \times AB$	$A^aAb \times A^aAb$	8	3	B	$AbAb$
				2	A	A^aA^a
2	$AB \times AC$	$A^aAb \times A^aAc$	5	3	AB	A^aAb
				2	BC	$AbAc$
9	$AB \times B$	$A^aAb \times AbAb$	30	1	A	A^aA^a
				1	AC	A^aA^c
1	$AC \times B$	$A^aAc \times AbAb$	5	1	AB	A^aAb
				21	AB	A^aAb
1	$AC \times B$	$A^aAc \times AbAb$	5	9	B	$AbAb$
				3	AB	A^aAb
4	$AC \times BC$	$A^aAc \times AbAc$	9	2	BC	$AbAc$
				3	BC	$AbAc$
1	$B \times B$	$AbAb \times AbAb$	6	3	C	A^cA^c
				1	AC	A^aA^c
1	$B \times BC$	$AbAb \times AbAc$	4	2	AB	A^aAb
				6	B	$AbAb$
1	$B \times C$	$AbAb \times A^cA^c$	4	3	B	$AbAb$
				1	BC	$AbAc$
1	$C \times C$	$A^cA^c \times A^cA^c$	3	1	BC	$AbAc$
				4	BC	$AbAc$
2	$AC \times C$	$A^aAc \times A^cA^c$	8	3	C	A^cA^c
				7	C	A^cA^c
1	$AC \times AC$	$A^aAc \times A^aAc$	3	1	AC	A^aA^c
				1	AC	A^aA^c
1	$AC \times AC$	$A^aAc \times A^aAc$	3	1	C	A^cA^c
				1	A	A^aA^a
1	$AB \times BC$	$A^aAb \times AbAc$	7	1	BC	$AbAc$
				5	AB	A^aAb
				1	AC	A^aA^c

Analizie poddano 32 pary rodzicielskie, reprezentujące 14 typów kojarzeń oraz przeprowadzono segregację antygenów układu A na 108 szt. ich potomstwa.

Na podstawie prób serologicznych i przebadanego dziedziczenia stwierdzono zależność między antygenami B, B₂ i C. Reakcja antysurowicy B₂ z antygenem B₂ zachodziła w każdym przypadku wystąpienia antygeny B lub C, a więc pomiędzy antygenem B i B₂ oraz C i B₂ istnieje linearne pokrewieństwo. Równocześnie antygen B₂ jest ogniwnem łączącym nielinearną zależnością antygeny B i C. Zależności te ilustruje rys. 1, z którego wynika, że trzy antygeny B, B₂ i C warunkowane są przez dwa

geny A^b i A^c . Gen A^b produkuje antygen B oraz B_2 , gen A^c — antygen C i również B_2 . Antygen B_2 jest więc niezależnym produktem genów A^b i A^c .



Rys. 1. Genetyczne i serologiczne zależności pomiędzy antygenami B, B_2, C układu A u norek

DYSKUSJA

Początkowo gdy w układzie A u norek znano tylko trzy antygeny krwinkowe A, B, B_2 , przypominał on układ ABO u człowieka. Dopiero antygen C wyjaśnił różnicę.

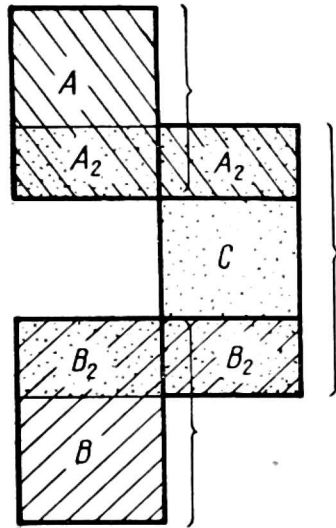
Ostatnie badania Rapacza na Uniwersytecie Wisconsin wykazały jeszcze jeden antygen należący do układu A , a mianowicie antygen A_2 związany linearną zależnością z A i C . Okazało się więc, że antygen C jest nielinearnie spokrewniony nie tylko z antygenem B lecz i z antygenem A . Tak więc model układu A u norek ulegnie zmianie. Wszystkie poznane dotychczas antygeny krwinkowe w tym układzie zostały połączone wspólną zależnością (rys. 2) (2). Dotychczas u żadnego gatunku zwierząt nie spotkano układu o podobnych zależnościach, które pozwalają dokładniej poznać genetykę grup krwi.

Badania nad grupami krwi u norek mają duże znaczenie praktyczne, jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że każdą samicę kryje się dwa razy, często używając różnych samców (1). W czasie odsadzania młodzieży od matek lub w przypadku wychowywania przez jedną samicę młodych od różnych matek, istnieje duże prawdopodobieństwo pomyłki w obrębie jednej odmiany barwnej. Ustalenie pochodzenia możliwe jest wtedy jedynie na drodze prób serologicznych, oczywiście w przypadku różnic antygenowych rodziców. Badania tego typu są tym dokładniejsze im większej liczby surowic do nich użyto. Dlatego prace nad otrzymaniem dalszych surowic testowych w naszym laboratorium będą kontynuowane.

Pięć antygenów krwinkowych A, A_2, B, B_2, C należących do układu A , wykrywanych przez pięć surowic testowych: $\text{anty } -A, -A_2, -B, -B_2, -C$

Trzy geny A^a, A^b, A^c determinujące pięć antygenów krwinkowych demonstrują genetyczne (ponieważ są allelami) i serologiczne pokrewieństwo (produkują częściowo wspólne antygeny)

Reakcje serologiczne



		S u r o w i c e					
	Fenotyp	Genotyp	Anty A	Anty A_2	Anty B	Anty B_2	Anty C
A^a	A	A^aA^a	+	+	-	-	-
	AB	A^aA^b	+	+	+	+	-
A^c	AC	A^aA^c	+	+	-	+	+
	B	A^bA^b	-	-	+	+	-
A^b	BC	A^bA^c	-	+	+	+	+
	C	A^cA^c	-	+	-	+	+

Rys. 2. Grupy krwi układu A u nerek

Układ A u nerek wydaje się być włączony w konflikt serologiczny (6), podobnie jak ABO i Rh u człowieka, którego konsekwencje mogą prowadzić do obniżenia płodności samic lub do padania miotów konflikto-
wych.

Wobec bardzo wysokiego procentu niepłodności wśród samic nerek oraz dużej liczby upadków młodzieży w kilka dni po urodzeniu, wydaje się niezwykle pilne sprawdzenie, czy nie jest to spowodowane przez konflikt serologiczny. Prace takie wymagają jednak dużego materiału doświadczalnego.

Nie zbadano także dotychczas różnic serologicznych poszczególnych odmian oraz materiału pochodzącego z różnych krajów. Dalsze prace niewątpliwie powinny iść również w tym kierunku, jednak jak zaznaczono już, wymagają one licznego i różnorodnego materiału, jakim niestety ferma Instytutu Zootechniki nie dysponuje.

STRESZCZENIE

Celem rozpoczęcia badań immunogenetycznych nad norkami drogą heteroimmunizacji kóz i królików oraz izoimmunizacji nerek otrzymano cztery surowice testowe identyfikujące cztery antygeny krwinkowe: A, B, B_2 i C . Należą one do jednego układu A i determinowane są przez geny z potrójnej serii alleli: A^a, A^b, A^c . Antygen B_2 jest produktem niezależnym specyficznego współdziałania genów A^b i A^c .

LITERATURA

1. Lisiński H.: Hodowla norek. PWRiL, Warszawa 1960.
2. Rapacz J., Hasler J., Shackelford R. M.: Additional Blood Factor "A₂" Independently Determined by two Allelic Genes: A^a and A^c of the System in the Domestic Mink. *Nature, Genetica Polonica* (praca w druku).
3. Rapacz J., Shackelford R. M.: *Genetics*, t. 54, nr 3, 1966, 917—922.
4. Rapacz J., Shackelford R. M.: *Nature*, t. 196, nr 4861, 1962, 1340—1341.
5. Rapacz J., Shackelford R. M.: *Journ. of Hered.* t. 57, nr 1, 1966, 19—22.
6. Rapacz J., Shackelford R. M.: Naturally Occurring and Immune Antibodies as a Possible Cause of Hemolytic Disease in the Domestic Mink. *Proc. of XI Cont. for Blood Group and Prot. Polim.* Warszawa 1968.

Веслава Крупиньска, Ян Рапач, Анна Казана

ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУПП КРОВИ У НОРОК

Резюме

При иммуногенетических исследованиях норок, путём гетероиммунизации коз и кроликов, а также изоиммунизации норок, были получены 4 тэстовые сыворотки, идентифицирующие 4 антигена кровяных телец A, B, B₂ и C. Относятся они к одному комплексу A и детерминированы через гены с тройной серией аллели A^a, A^b и A^c.

Антиген B₂ является независимым продуктом специфического взаимодействия генов A^b и A^c.

Wiesława Krupińska, Jan Rapacz, Anna Kazana

STUDY ON BLOOD GROUPS IN DOMESTIC MINK

Summary

In order to begin immunogenetic investigation in the domestic mink, attempts were made to produce reagents by using rabbits, goats and mink. From the iso- and heteroimmunoserum which were produced four reagents were obtained. Four blood factors A, B, B₂ and C were recognized by use of these reagents. Pedigree analysis suggests that the A, B, B₂ and C factors belong to one system named A and depend on genes of triple allelic series.

Patterns of reaction indicate that between the factors B, and B₂, C and B₂ there is a subtype relationship which is called linear, and the B₂ antigen is produced by both genes as a overlapping specificity.