
Ivana Joksić

Skrining tehnika za dokazivanje preosetljivosti na mleko

Preosetljivost na proteine hrane odlikuje se prisustvom specifičnih antitela u humanom serumu. U cilju dijagnostikovanja ove bolesti koriste se Elisa i Western-blot metode. Kako su obe metode izuzetno zahtevne u pogledu vremena i opreme, cilj ovog rada bio je da se osmisli jednostavnija i brža tehnika za dokazivanje preosetljivosti na proteine mleka. U tu svrhu modifikovana je i specifično pripremljena Dot-blot metoda. Kako bi se utvrdila funkcionalnost i validnost nove metode, analizirano je 10 seruma pacijenata čija je prosetljivost bila prethodno dokazana Western-blot metodom. Dobijeni rezultati su pokazali da je nova metoda podjednako pouzdana i reproducibilna kao i Western-blot metoda. Dot-blot je kvalitativni postupak, ali modifikovan na ovaj način on je i semikvantitativan jer je moguće utvrditi koja klasa imunoglobulina učestvuje u imunom odgovoru. Prednosti ove metode nad drugim kvantitativnim postupcima su što ne zahteva kompleksnu laboratorijsku opremu i što se rezultati mogu dobiti u izuzetno kratkom vremenskom roku (3 sata).

Uvod

Jedna od osnovnih karakteristika imunog sistema je sposobnost da antigene sa kojima dolazi u kontakt prepozna kao strane ili kao vlastite. U prvom slučaju dolazi do indukovanja imunog odgovora, a u drugom tolerancije. Imuna tolerancija je specifična imunološka nereaktivnost organizma na određeni antigen i od izuzetne je važnosti za njegovo normalno funkcionisanje. Kao vlastite antigene imuni sistem prepoznaje i proteine hrane. Ukoliko dođe do poremećaja ovog mehanizma razvija se preosetljivost na određene antigene jer organizam reaguje na njih kao na strane antigene. Preosetljivost na proteine hrane odlikuje se prisustvom specifičnih antitela u humanom serumu. U najčešće oblike preosetljivosti spada preosetljivost na proteine mleka (preosetljivost na kazein i proteine surutke). Prilikom konzumiranja mlečnih proizvoda, u serumu preosetljivih osoba generišu se

*Ivana Joksić (1980),
Beograd, Poručnika
Spasića i Mašare 6,
učenica 3. razreda
XIII beogradske
gimnazije*

antitela na proteine mleka i dolazi do reakcije antigen-antitelo. U isto vreme, novonastala antitela izazivaju i aktivaciju komplementa – osnovnog efektnog sistema u humoralnoj imunosti. Kako komplement ima ključnu ulogu u mehanizmima koji dovode do definitivne eliminacije antigena, značajan je u razvijanju inflamatornih procesa. Učestala pojava zapaljen-skih reakcija za posledicu ima nestajanje crevnih resica i izravnavanje površine creva. Zbog smanjenja crevne površine dolazi do pojave malap-sorpcije.

Različita klinička slika kod pacijenata kao i nedovoljno proučeni mehanizmi koji dovode do ovakvih poremećaja zahtevaju opsežna klinička i laboratorijska ispitivanja koja se obavljaju Elisa ili Western-blot meto-dama. Elisa testovi omogućavaju kvantitativno određivanje pojedinačnih proteina pa se primenjuju i za utvrđivanje antitela. Kako se kod preosetljivosti na određene alergene obično razvije širok spektar antitela, za dokazivanje preosetljivosti potrebno je uraditi čitavu paletu analiza Elisa metodom. Prednost ove metode je što se precizno može odrediti kon-centracija prisutnih antitela. Western-blot metode omogućavaju detekciju više proteina (antitela) istovremeno, pri čemu se koncentracije pojedinih proteina ne mogu precizno odrediti, te je metoda semikvantitativna. Obe metode su izuzetno zahtevne u pogledu vremena i opreme te nisu pogodne kao skrining metode za dokazivanje preosetljivosti.

Cilj ovog rada je da se osmisli brza, tačna i jednostavna metoda za dokazivanje preosetljivosti na mleko. Kao osnova za novu metodu korišćen je Dot-blot postupak koji je modifikovan i specifično pripremljen.

Materijal i metode

U svrhu utvrđivanja funkcionalnosti i validnosti nove metode za analizu je uzeto 10 seruma pacijenata preosetljivih na mleko. Antitela na kazein i proteine surutke u njihovom serumu dokazana su Western-blot metodom u Zavodu za transfuziju krvi Republike Srbije. Svakom pacijentu analize su obavljene dva puta radi provere reproducibilnosti metode i svaki serum testiran je na IgG, IgM i IgA antitela. Kao kontrolna grupa korišćen je normalni humani serum.

U cilju dijagnostikovanja preosetljivosti na proteine mleka korišćena je specifično pripremljena Dot-blot metoda. Pre početka rada sa ovom me-todom potrebno je da se pripreme uzorci kazeina i proteina surutke. Za njihovu izolaciju iz mleka potrebno je 100 mL obranog delipidiranog mleka razblažiti sa destilovanom vodom u odnosu 1:5. U sud sa razbla-ženim mlekom uroni se elektroda pH-metra i lagano uz mešanje dodaje se 0.1 mol/L HCl do pH vrednosti 4.61 (izoelektrična tačka kazeina). Uzorak

se centrifugira i supernatant (proteini surutke) se stavlja u crevo za dijalizu i dijalizira prema 0.2 mol/L bikarbonatnom puferu pH 9.6 preko noći na +4°C. Kazein se tretira na isti način.

Dot-blot postupak

Listovi imobilona isečeni su na trake veličine 3×0.5 cm. (pri tome su korišćene čiste gumene rukavice i pribor). Sa traka imobilona isečen je gornji desni ugao radi kasnije lakše orijentacije. Trake imobilona najpre su 2-3 sec držane u metanolu, a zatim su potopljene u destilovanu vodu. Pošto potonu, imobilon je izvađen i stavljen na čist filter papir. Na gornji deo trake imobilona nakapano je 20 μ L rastvora kazeina koncentracije 1 g/L u bikarbonatnom puferu, a na donji deo rastvor proteina surutke u bikarbonatnom puferu iste koncentracije. Pošto su trake imobilona osušene stavljene su u blokirajući pufer (3%-tni želatin u Tween 20 tris-glicin-HCl puferu pH 7-7.5 ili 3%-tni goveđi albumin u TTBS-u) i inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljen imobilon stavljen je u suhu čistu epruvetu sa zapušačem u koju je sipano 1 mL seruma pacijenta razblaženog 1:10 u TTBS-u. Nakon 1h inkubacije na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje na rotacionoj mešalici tečnost iz epruvete je odlivena. Posle ispiranja tri puta u TTBS-u u epruvetu je sipan 1 mL zečijeg anti-humanog IgG, odnosno IgM i IgA antiseruma. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 30 min. uz lagano mešanje, a potom su isprani tri puta u TTBS-u. Nakon toga u epruvete je dodato po 1 ml konjugovanog anti-zec IgG antiseruma obeleženog peroksidazom razblaženog 1:500 u TTBS-u i ponovo su inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon tri dodatna pranja u TTBS-u naliven je 1 mL rastvora supstrata (5 ml TBS-a + 1 mL 4-hlor-naftola + 5 μ L koncentrovanog H₂O₂) i sačekano je da se pojave pozitivne reakcije u ispitivanim uzorcima. Reakcija je prekinuta ispiranjem u destilovanoj vodi, a trake imobilona su ostavljene na staklo da se osuše.

Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja preosetljivosti na kazein i proteine surutke prikazani su u tabelama 1 i 2.

Dobijeni rezultati pokazuju da je modifikovana Dot-blot metoda podjednako pouzdana i reproducibilna kao i Western-blot metoda. U svim ispitivanim uzorcima detektovana su antitela na kazein. Serumii pet pacijenata sadrže antitela na proteine surutke, a njihova najveća koncentracija utvrđena je u uzorku broj 5. Najveća količina antitela na kazein prisutna je u uzorku broj 4, dok najmanju preosetljivost na ovaj protein pokazuje serum pacijenta broj 2.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja preosetljivosti na kazein

Uzorci	IgM		IgG		IgA	
	I	II	I	II	I	II
Uzorak 1	2	2	2	2	1	1
Uzorak 2	1	1	2	2	1	1
Uzorak 3	1	1	2	2	1	1
Uzorak 4	3	3	3	3	3	3
Uzorak 5	2	2	3	3	3	3
Uzorak 6	2	2	2	2	3	3
Uzorak 7	2	2	2	2	3	3
Uzorak 8	3	3	0	0	2	2
Uzorak 9	2	2	2	2	3	3
Uzorak10	2	2	2	2	0	0
NHS	0	0	0	0	0	0

0 – bez reakcije; 1 – slaba reakcija; 2 – dobra reakcija; 3 – izuzetna reakcija; NHS – normalni humani serum; I – prvo merenje; II – drugo merenje

Tabela 2. Rezultati ispitivanja preosetljivosti na proteine surutke

Uzorci	IgM		IgG		IgA	
	I	II	I	II	I	II
Uzorak 1	3	3	2	2	2	2
Uzorak 2	1	1	1	1	1	1
Uzorak 3	0	0	0	0	0	0
Uzorak 4	2	2	2	2	2	2
Uzorak 5	3	3	3	3	2	2
Uzorak 6	1	1	1	1	1	1
Uzorak 7	0	0	0	0	0	0
Uzorak 8	0	0	0	0	0	0
Uzorak 9	0	0	0	0	0	0
Uzorak10	0	0	0	0	0	0
NHS	0	0	0	0	0	0

0 – bez reakcije; 1 – slaba reakcija; 2 – dobra reakcija; 3 – izuzetna reakcija; NHS – normalni humani serum; I – prvo merenje; II – drugo merenje

Zaključak

Dot-blot postupak je kvalitativna metoda, ali modifikovan na ovaj način je i semikvantitativan jer je moguće utvrditi koja klasa imunoglobulina učestvuje u imunom odgovoru. Jedna od prednosti ove metode nad

drugim kvantitativnim postupcima je izuzetna brzina kojom se dobija rezultat (3 sata) i zbog toga je naročito pogodna kao skrining tehnika za analizu velikog broja uzoraka. Zbog toga što ne zahteva kompleksnu laboratorijsku opremu pogodna je za izvođenje u svim laboratorijama što je ujedno i njena najveća prednost.

Literatura

Miletić, V., Miletić, I. 1997. *Imunoheмиjske metode*. Beograd: Društvo bioheмиčara Jugoslavije

Paranos, S. 1993. *Nutritivna alergija*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Paranos, S., Nikolić, G. 1996. Antibodies to cow milk proteins in chronic urticaria. *Allergy*, 51: 273-5

Ivana Joksić

Screening Technicque for Detecting of Hypersensitivity on Milk

Hypersensitivity on food proteins is characterized with presence of specific antibodies in human serum. For diagnostic purposes Elisa and Western-blot methods are usually used. Both methods are complex and time-consuming. The aim of this work was to design a rapid and simple method for detecting hypersensitivity of food proteins. For this purpose Dot-blot technique was modified. The suitability of modified Dot-blot technique was established using serum of patients previously examined by Western-blot method. The obtained results showed that our modified Dot-blot method is as reliable and precise as Western-blot method. According to the results obtained we can conclude that such a modification of the Dot-blot method improved it from a qualitative to a semi-quantitative technique for measuring hypersensitivity of food proteins. It was also shown that different subclasses of antibodies can be unequivocally detected.

