

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 28, No 3 (1977)

Υπεύθυνοι συμφώνως τῷ νόμῳ
 ΔΙΟΙΚΗΤΗΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
 Ἐπιστημονικὸν Σωματεῖον ἀνεγνωρισμένον, ἀριθ. ἀποφ. 5410/19.2.1925 Πρωτοδικείου Ἀθηνῶν.
 Πρόεδρος διὰ τὸ ἔτος 1977:
 Κων. Ταρλατζής

ΕΚΔΟΤΗΣ: Ἐκδίδεται ὑπὸ αἰρέτης πενταμελούς συντακτικῆς ἐπιτροπῆς (Σ.Ε.) μελῶν τῆς Ε.Κ.Ε.
ΥΠ/ΝΟΣ ΣΥΝΤΑΞΕΩΣ: Ὁ Πρόεδρος τῆς Σ.Ε. Λουκῆς Εἰσαθίου, Ζαλοκώστα 30, Χαλάνδρι
Μέλη Συν/κῆς Ἐπ.:
 Χ. Παμπούς
 Μ. Μαστρογιάννη
 Κ. Σειταρίδης
 Α. Σεϊμένης
Στοιχειοθεσία - Ἐκτύπωση:
 ΕΠΙΓΛΑΦΟΣ Ε.Π.Ε.
 Ἀρδῆτιος 12 - 16 - Ἀθήναι
 Τηλ. 9217513 - 9214820
ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ: Ἀθήναι

Ταξ. Διεύθυνσις:
 Ταξ. θορῆς 546
 Κεντρικὸν Ταχυδρομεῖον Ἀθηνῶν

Συνδρομαί:
 Ἔτησις ἑσπερικῆς δρχ. 300
 Ἔτησις ἑξωτερικῆς » 450
 Ἔτησις φοιτητῶν ἡμεδαπῆς » 100
 Ἔτησις φοιτητῶν ἀλλοδαπῆς » 150
 Ἔτησις ἑκάστου τεύχους » 75
 ἄλλα κλπ. » 500

Διεύθυνσις: P.O.B. 546
 Central Post Office
 Athens - Greece

Redaction: Dr. L.Efstathiou
 Zalokosta 30,
 Halandri
 Greece

Subscription rates:
 (Foreign Countries)
 \$ U.S.A. 15 per year.



Δελτίον
 ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
 ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΙΣ
 ΠΕΡΙΟΔΟΣ Β
 ΤΟΜΟΣ 28 Ἰούλιος - Σεπτέμβριος
 ΤΕΥΧΟΣ 3 1977

Bulletin
 OF THE HELLENIC
 VETERINARY MEDICAL SOCIETY

QUARTERLY
 SECOND PERIOD
 VOLUME 28 July - September
 No 3 1977

Ἐπιταγαὶ καὶ ἐμβάσματα δέον ὄπως ἀποστέλλονται ἐπ' ὀνόματι κ. Ἰγν. Ἀξιώτη, Ἐργαστήριον Ἴων, Ἁγία Παρασκευὴ - Ἀττικῆς.

Separation of foot and mouth disease virus neutralizing antibodies by ion exchanger

I. A. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

doi: [10.12681/jhvms.21306](https://doi.org/10.12681/jhvms.21306)

Copyright © 2019, I. A. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ I. A. (2019). Separation of foot and mouth disease virus neutralizing antibodies by ion exchanger. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 28(3), 147–156. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21306>

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΑΦΘΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΑΝΤΑΛΛΑΚΤΗ ΑΝΙΟΝΤΩΝ.

Υπό

I. A. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗ*
Τεχνική συνεργασία Θ. ΤΕΛΩΝΗ*

SEPARATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES BY ION EXCHANGER

By

I. DIMITRIADIS*

SUMMARY

Using chromatography with ion exchanger DEAE-50, Foot-and-Mouth Disease types, O, A and C neutralizing antibodies were separated from hyperimmune cattle serum.

The first fraction (Fraction No 0) behaves in electrophoresis and immune electrophoresis (slow movement to the anod) like Ig G₂ and its neutralizing antibodies titre is higher than in the other fractions (Fraction No 1-4) corresponding to Ig G₁. From the fractions of the hyperimmune serum, which were tested, Foot-and-Mouth Disease types A and O neutralizing antibodies were isolated with relatively low titres. The same serum tested as whole serum had Food-and-Mouth Disease neutralizing antibodies of types A, O and C 1:216, 1:512 and 1:32 respectively.

The fraction No 1-4 of the serum behaving in electrophoresis like Ig G₁ unlike Ig G₁ of the colostrum, did not show the hemocytotropism phenomenon.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για να γίνει πιο σαφής η φύση των φυσιολογικών σφαιρινών και η κινητικότητα των ανοσοσφαιρινών, έγιναν πολλές εργασίες (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Έκτεταμένες εξετάσεις ανοσοσφαιρινών του ανθρώπινου ορού απέδειξαν, πώς υπάρχουν τρεις μεγάλες (IgG, IgM, IgA) και δύο μικρές (IgD, IgE) κατηγορίες ανοσοσφαιρινών (16, 17).

Ό ποσοτικός καθορισμός με ανοσοχημικές μεθόδους έχει αποδείξει, ότι μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων υπάρχει χαρακτηριστική διαφορά ώρισμένων κατηγοριών σφαιρινών στο πλάσμα του ανθρώπου (18, 19).

Στά βοοειδή, μεταξύ διαφόρων φυλών, διαπιστώθηκε επίσης μεγάλη διακύμανση της ποσότητας των ανοσοσφαιρινών, πράγμα που δεν είναι βέβαιον κατά πόσον οφείλεται σε γενετικές διαφορές ή στον τρόπο διατροφής και διαμονής των ζώων. Μια ποσοτική σύγκριση μεταξύ των IgG και IgM, στον ορό βοοειδών και στο πρωτόγαλα, απέδειξε σχέση 12,9:2,8 και 34,1:4,9 αντίστοιχα (20).

* Κτηνιατρικό Ίνστιτούτο Αφθώδους Πυρετού, Αγ. Παρασκευή

Στους όρους βοοειδών απομονώθηκαν οι άνοσοσφαιρίνες IgG, IgA και IgM^(3, 9) που ό ρόλος τους στην παθολογία τών βοοειδών δέν είναι άκόμη γνωστός⁽³⁾. Άντισωματική ιδιότητα έχουν περισσότερες κατηγορίες άνοσφαιρινών⁽²⁰⁾. Σάν πρώτη άνοσοβιολογική άπάντηση τών βοοειδών έμφανίζονται οι άνοσοσφαιρίνες IgM, που δέν παραμένουν για πολύ χρόνο και στή συνέχεια έμφανίζονται οι άνοσοσφαιρίνες IgG⁽¹⁰⁾, που παραμένουν έπί πολλούς μήνες⁽²⁹⁾.

Ή IgG διαχωρίστηκε (μέ την χρωματογραφία, ήλεκτροφόρηση, άνοσοηλεκτροφόρηση), σέ IgG₁ και IgG₂^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 11, 13, 14).

Άνάλογα μέ τό είδος άνταλλάκτη ίόντων και την πυκνότητα ίόντων του ρυθμιστικού διαλύματος, που χρησιμοποιείται για την έκλυση του πηκτώματος του άνταλλάκτη άνιόντων, ή IgG₁ διαχωρίζεται άπό την IgG₂.

Ή IgG₂ που έχει πιό θετικό ήλεκτρικό φορτίο άπό την IgG₁ έκλύεται πρώτη, ένώ ή IgG₁ έκλύεται μετά την αύξηση τών ίόντων ή του PH του έκλύτη. Στην ήλεκτροφόρηση και στην άνοσοηλεκτροφόρηση ή IgG₂ κινείται πιό άργά προς την άνοδο^(1, 3, 7).

Ή διαφοροποίηση μεταξύ τών IgG₁ και IgG₂ γίνεται βάσει τής σύνθεσης τών άμινοξέων και τής άντιγονικότητας που βρίσκεται στο τμήμα Fc του μορίου τής σφαιρίνης^(3, 4, 6, 13, 9, 15).

Ή IG₁ συγκεντρώνεται έκλεκτικά στο πρωτόγαλα, συμβάλλει στην παθητική άνοσία τών μόσχων, έκτρέπει τό συμπλήρωμα και εύαισθητοποιεί τό δέρμα τών βοοειδών^(3, 4).

Μέ χρωματογραφία σέ άνταλλάκτη ίόντων απομονώθηκε άπό όρο βοοειδών μετά άπό μόλυνση μέ Anapl. Marginale, στην όξεία φάση τής νόσου, σέ ώρισμένο κλάσμα, άνοσοσφαιρίνη που έχει την ιδιότητα έκτροπής του συμπληρώματος⁽²⁾.

Άλλοι έρεύνησαν την κινητικότητα τών άντισωμάτων σέ βοοειδή μετά άπό πρωτοεμβολιασμό και έπανεμβολιασμό μέ άντιαφθωδικό έμβόλιο⁽⁸⁾.

Στην παρούσα έργασία γίνεται προσπάθεια διαχωρισμού τών έξουδετερωτικών άντισωμάτων του όρου βοοειδών που ύπερανοσοποιήθηκαν κατά του ίου του Άφθώδους Πυρετού. Ό διαχωρισμός τών άντισωμάτων έγινε μέ την μέθοδο τής χρωματογραφίας σέ άνταλλάκτη άνιόντων (DEAE-Sephadex A-50) και μετά μελετήθηκαν αυτά ως προς την ήλεκτροφορική και άνοσοηλεκτροφορική των συμπεριφορά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Έμβολιάστηκαν 3 βοοειδή μέ τριδύναμο έμβόλιο Άφθώδους Πυρετού τύπου A (στέλεχος Ξάνθης 1972), O (στέλεχος Πέπλου 1972) και C₁ (στέλεχος C-Detmold). 21 μέρες μετά τον έμβολιασμό μολύνθηκαν τά ζώα μέ όμόλογο ίό τύπου A και O (όχι μέ C₁) και μετά άπό 15 μέρες έμβολιάστηκαν άλλες δύο φορές μέ τριδύναμο έμβόλιο σέ άπόσταση 15 ήμερών. Δύο έβδομάδες μετά τον τελευταίο έμβολιασμό έγινε αίμοληψία και παρασκευή μίγματος όρου και άπό τά τρία βοοειδή για τον διαχωρισμό τών άνοσοσφαιρινών.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ἡ κατακρήμνιση τῶν σφαιρινῶν ἔγινε μὲ διάλυμα θειικοῦ ἀμμωνίου ⁽²¹⁾. Ἡ ἀφαλάτωση τῶν σφαιρινῶν ἀπὸ τὸ θειικὸ ἀμμώνιο ἔγινε σὲ στήλη (2,6×40 ἐκ.) μὲ πήκτωμα Sephadex G-25 Normal (τῆς Pharmacia Uppsala) ὕψους 20 ἐκ. πὺ σταθεροποιήθηκε ὑπὸ ὕδροστατικῆ πίεση 40-60 ἐκ. Γιά τὴν σταθεροποίηση καὶ τὴν ἔκλυση τῆς στήλης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικὸ διάλυμα Tris 0,01M pH 7,6.

Τὶς σφαιρίνες πὺ ἀφαλάτώσαμε τὶς χρωματογραφήσαμε σὲ πήκτωμα ἀνταλλάκτη ἀνιόντων Diaethyl -Aminoethyl A50 (DEAE A-50 τῆς Ph. Uppsala, Capacity 3,5±0,5 MEQ/γραμ. Part size 40-120 μ) 2,6×15 ἐκ. Ἡ σταθεροποίηση καὶ ἔκλυση τῆς στήλης ἔγινε μὲ ρυθμ. διάλ. Tris 0,01 M pH 7,6.

Μετὰ τὴν προσθήκη 5 κ.ἐκ. πρωτεϊνῶν (350 χιλιογρ. συνολικὲς πρωτεΐνες) στὴν ἐπιφάνεια τοῦ πηκτώματος, ἀκολούθησε ἡ ἔκλυση. Πρῶτα ἔγινε ἔκλυση τῆς στήλης μὲ δύο ὄγκους τοῦ πηκτώματος ἤτοι περίπου μὲ 150 κ.ἐκ. ρυθμ. διάλυμα καὶ τὸ κλάσμα πὺ πήραμε χαρακτηρίστηκε κλάσμα No 0. Μετὰ συνδέσαμε τὴν στήλη μὲ τὸ σύστημα γραμμικῆς ἔκλυσης (500 κ.ἐκ. ρυθμ. διάλυμα 0,01M, pH 7,6 καὶ 500 κ.ἐκ. ρυθμ. διαλ. Tris 0,01M pH 7,6+0,3 M Na-CL (σκτ. No 1) καὶ συλλέξαμε ἄλλα 6 κλάσματα σὲ ὄγκο ἴσο πρὸς τὸν ὄγκο τοῦ πηκτώματος καὶ ἐπακολούθησε ἡ συμπίκνωση αὐτῶν σὲ 5 κ.ἐκ. μὲ ὑποπίεση σὲ σάκκουσ διαλύσεως (σκτ. No 2).

Ἡλεκτροφόρηση καὶ ἀνοσοηλεκτροφόρηση.

Γιά ἡλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμ. διάλ. Diaetyl-Barbitur-Acetat pH 8,6 (DBA) 13,38 γρ. Barbital-Natrium 8,83 γρ. Natrium Acetat, 3H₂O σὲ 1,5 λίτρο ἀπεσταγμένο νερὸ καὶ ρύθμιση τοῦ pH σὲ 8,6 (μητρ. διάλ).

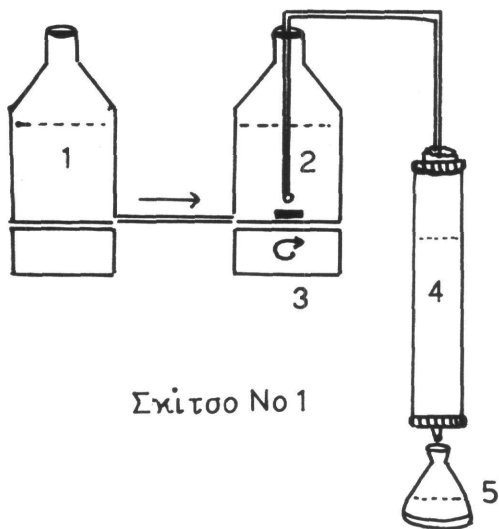
Ἡ ἡλεκτροφόρηση ἔγινε ἐπάνω σὲ μεμβράνες Sepharose III (Cellulose Polyacetate Elektrophoresis Strips Gelman) ⁽²⁴⁾ σὲ συσκευὴ Thomas Mod 20, 250 Volt/35'. Ὡς ἡλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε τὸ μητρικὸ διάλυμα DBA ἀραιωμένο 3+2 μὲ ἀπεσταγμένο νερὸ.

Ἡ ἀνοσοηλεκτροφόρηση ἔγινε ἐπάνω σὲ ἀντικειμενοφόρες πλάκες 2×2,7 ἐκ. μὲ 3 κ.ἐκ. 2% ἄγαρ, διαλυμένο μέσα σὲ μητρικὸ διάλυμα DBA ἀραιωμένο 1+1 μὲ ἀπεσταγμένο νερὸ ⁽²²⁾. Οἱ θάλαμοι τῆς συσκευῆς εἶχαν ὡς ἡλεκτρολύτη διάλυμα DBA ἀραιωμένο 2+1 μὲ ἀπεσταγμένο νερὸ. Ἡ ἀνοσοηλεκτροφόρηση ἔγινε στὴν ἴδια συσκευὴ ὅπως καὶ ἡ ἡλεκτροφόρηση 250 Volt/45'. Μετὰ τὴν ἡλεκτροφόρηση προστέθηκε στὸ ἀντίστοιχο σημεῖο τῆς πλάκας ὄρος κοκίλου ἀντὶ ὄρου βοῦς καὶ ἔγινε ἐπάωση σὲ ὑγρὸ κλίβανο 18 ὥρες σὲ θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ὁροεξουδετέρωση

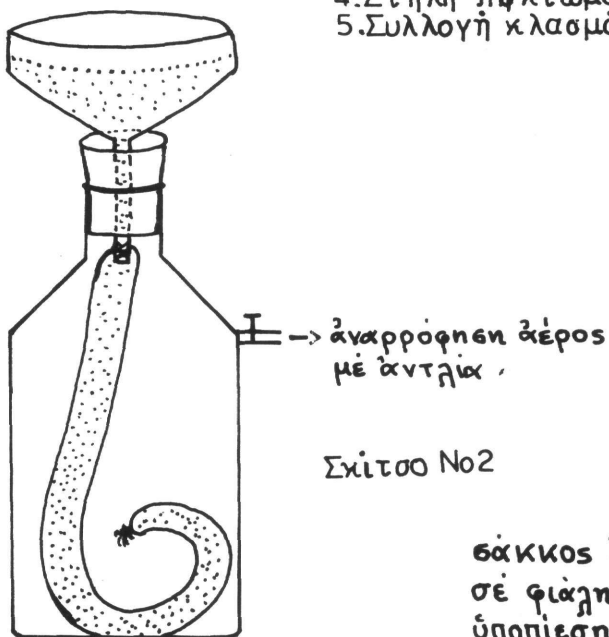
Τὰ κλάσματα πὺ συλλέξαμε ἐλέγχθηκαν γιά ἐξουδετερωτικὰ ἀντισώματα τοῦ ἰοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ ⁽²⁵⁾ σὲ κύτταρα IB-RH. Χρησιμοποιήθηκαν 100 TCID₅₀ ἰοῦ κατὰ κ. ἐκ. Ἡ ἀνάγνωση ἔγινε μετὰ 24 καὶ 48 ὥρες ἀπὸ τοῦ ἐνοφθαλμισμοῦ τῶν κυττάρων μὲ τὸ μίγμα ἰοῦ + ὄρου.

Τὸν ὄρο κοκίλου ἀντιοροῦ βοῦς τὸν παρασκευάσαμε μὲ ἐγχύσεις συζεύ-



Σχίτσο Νο 1

- Σύστημα γραμμικής κλασμάτωσης
1. 500cc 0,3M NaCl
 2. 500cc 0,01M Ρυθμ. διαλ. pH 7,6
 3. Μαγνίτης
 4. Στήλη πηκτώματος
 5. Συλλογή κλασμάτων



Σχίτσο Νο 2

βάκκος διαχύσεως μέσα
σε φιάλη με ατμοσφαιρική
ύποπνση.

γματος όρου βοός με πλήρη Freund-Adjuvans (1,5 κ.έκ. όρος + 1,5 κ.έκ. Adjuvant) ύποδόρια 8 φορές κάθε 7 ήμέρες. Μία έβδομάδα μετά την τελευταία έγχυση έγινε άφαιμαξη των κονίκλων και έλεγχος του όρου με την μέθοδο της άνοσοδιάχυσης .

Παραγωγή IgG₁.

Παράλληλα πήραμε από μία τυχαία αγελάδα πρωτόγαλα πρώτης ήμέρας, που είναι πλούσιο σε IgG₁⁽¹⁾, έπεξεργαστήκαμε με την ίδια μέθοδο του όρου και τό συγκρίναμε με τις σφαιρίνες του όρου στην ήλεκτροφόρηση άνοσοηλεκτροφόρηση και εναισθητοποίηση του δέρματος.

Ευαισθητοποίηση όμολόγου δέρματος (όμοιοκυτταροτροπισμός ⁽³⁾).

Για την διαφοροποίηση του IgG₁ από τό IgG₂ ένοφθαλμίσαμε ένδοδερμικώς 0,10 κ.έκ. από κάθε δείγμα και παρακολούθησαμε την αντίδραση ένα 24/ωρο. Για τόν σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ένα μόσχο 14 μηνών. Τά σημεία, όπου ένοφθαλμίσαμε τά δείγματα ξυρίστηκαν την προηγούμενη μέρα ^(26, 27).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την χρωματογραφία των σφαιρινών σε άνταλλάκτη ανιόντων DEAE A-50 έκλύθηκαν με τό άρχικό ρυθμ. διάλυμα στους δύο πρώτους δγκους του πήκτώματος, ήτοι στο κλάσμα Νο 0, σφαιρίνες που στην ήλεκτροφόρηση και την άνοσοηλεκτροφόρηση έχουν βραδεία κινητικότητα προς την άνοδο.

Σε σύγκριση με την αντίστοιχη εικόνα του πλήρους όρου βοός, οι σφαιρίνες αυτές που δέν κατακρατήθηκαν από τό πήκτωμα, αντίστοιχούν στις σφαιρίνες του πλήρους όρου που δίνουν από την άθοδο προς την άνοδο την πρώτη ταινία στην ήλεκτροφόρηση και τό πρώτο τόξο στην άνοσοηλεκτροφόρηση.

Η IgG₂ που τό ήλεκτρικό της φορτίο είναι θετικό, είναι ή σφαιρίνη που δέν κατακρατείται στο πήκτωμα και έκλύεται πρώτο, ένω στην ήλεκτροφόρηση και άνοσοηλεκτροφόρηση έχει βραδεία κινητικότητα προς την άνοδο ^(1, 3, 7).

Τά έπόμενα τέσσερα κλάσματα, που πήραμε μετά την σύνδεση της στήλης στο σύστημα γραμμικής κλασματώσεως, περιέχουν μία πρωτεΐνη που στην ήλεκτροφόρηση και άνοσοηλεκτροφόρηση δίνει ταινία και τόξο αντίστοιχα με την IgG₁ του πλήρους όρου και βρίσκεται άμέσως μετά την IgG₂ προς την άνοδο.

Η IgG₁ έχει πιό άρνητικό φορτίο από την IgG₂, συνδέεται στο πήκτωμα και έκλύεται μόνον με την αύξηση των ίόντων ή την έλάττωση του pH και στην ήλεκτρο-άνοσο-ήλεκτροφόρηση κινείται ταχύτερα προς την άνοδο ⁽¹⁾.

Στό πέμπτο κλάσμα παρουσιάσθηκε και μία δεύτερη σφαιρίνη στην περιοχή των β-σφαιρινών, ένω στο έκτο κλάσμα εμφανίσθηκαν και άλμπουμίμες και ως μη καθαρά κλάσματα δέν έξετάσθηκαν περαιτέρω.

Με την χρωματογραφία του πρωτογάλακτος πήραμε επίσης 6 κλάσματα. Η IgG₁ έκλύθηκε στο κλάσμα Νο3 μετά την σύνδεση της στήλης στο σύστη-

μα γραμμικής κλασματώσεως. Ἡ ἠλεκτρο-καὶ ἀνοσοηλεκτρικὴ συμπεριφορὰ ἀντιστοιχεῖ μὲ τὰ κλάσματα Νο1-4 τοῦ ὄρου.

Στὴν συνέχεια ἐξετάσαμε τὰ κλάσματα ποὺ πήραμε ὡς πρὸς ἐξουδετερωτικά ἀντισώματα (βλ. πίνακα 1 καὶ σχῆμα 3A).

Ὁ πλήρης ὄρος τῶν βοοειδῶν ἔδωσε κατὰ τὴν ἐξουδετέρωση μὲ 100 TCID₅₀ 1 κ.έκ. τοῦ τίτλου ἀντισωμάτων 1:128, 1:512 καὶ 1:32 ὡς πρὸς A, O καὶ C₁ ἀντίστοιχα (σχῆμα 3A).

Τὸ κλάσμα Νο 0 ἔχει τίτλο ἐξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων 1:128 καὶ 1:32 καὶ τὸ μίγμα κλάσματος Νο1-4 1:2 καὶ 1:16 ὡς πρὸς A καὶ O ἀντίστοιχα, ἐνῶ ὡς πρὸς C δὲν ἀνιχνεύθηκαν ἀντισώματα στὰ κλάσματα ποὺ ἐξετάσαμε. Κατὰ τοὺς Murphy καὶ συν. καὶ Rice καὶ συν. (26, 27) ἡ I G₁ εὐαίσθητοποιεῖ τὸ δέρμα ὁμολόγου ζώου.

Μετὰ ἀπὸ ἐνδοδερμικὴ ἔγχυση 0,10 κ.έκ. πλήρους ὄρου βοός, πλήρους ὄρου προβάτου, ρυθμιστικοῦ διαλύματος, κλάσματος Νο0 καὶ Νο1-4 τοῦ ὄρου καθὼς καὶ κλάσμα Νο3 πρωτογάλακτος ἀγελάδος, παρατηρήθηκε τοπικὴ ἀντίδραση τοῦ δέρματος μόνον ἔναντι τοῦ τελευταίου δείγματος. Ἀμέσως μετὰ τὴν ἐνδοδερμικὴ ἔγχυση ἡ διάμετρος τοῦ σημείου ἐγγύσεως ἦταν 0,6-0,8 ἐκ. Εἴκοσι λεπτά μετὰ τὴν ἔγχυση παρέμεινε ἡ διάμετρος ὄλων τῶν σημείων σταθερὴ πλὴν τῶν σημείων τοῦ κλάσματος Νο3 πρωτογάλακτος, ὅπου ἡ ἀντίδραση ἀνῆλθε σὲ 2,5 ἐκ. καὶ παρέμεινε ἐπὶ 4 ὥρες. 20 ὥρες μετὰ τὴν ἔγχυση ἡ ἀντίδραση ὑποχώρησε σὲ ἓνα ὄζιδιο χωρὶς ἐξελκώσεις.

Οἱ F. Murphy καὶ συν. (2) ἐπεξεργάστηκαν ὄρο βοοειδῶν μὲ χρωματογραφία καὶ συσχέτισαν τὴν ἀντισωματικὴ δραστηριότητα τοῦ ὄρου μὲ τὶς ἀνοσοσφαιρίνες ποὺ κινοῦνται στὴν ἠλεκτροφόρηση ταχέως πρὸς τὴν ἀνοδο (IgG₁) καὶ μὲ τὶς IgM ἀνοσοσφαιρίνες. Στὰ δύο Peak ποὺ ἔχουν ληφθῆ τὸ πρῶτο εἶχε σφαιρίνες ποὺ κινοῦνται βραδέως πρὸς τὴν ἀνοδο (IgG₂), ἐνῶ οἱ σφαιρίνες στὸ δεῦτερο Peak ἐκινοῦντο βαθμηδὸν ταχύτερα πρὸς τὴν ἀνοδο. Ἀπὸ ὄρου βοοειδῶν μολυσμένων μὲ *Anaplasma Marginale*, κατὰ τὴν ὀξεῖα φάση τῆς νόσου, ὁ μέσος ὄρος τῶν IgG τῆς ἐκτροπῆς τοῦ συμπληρώματος ἀπομονώθηκε στὸ κλάσμα 21 ἤτοι στὴν ἀρχὴ τοῦ Peak II⁽²⁾.

Οἱ Chappuis καὶ συν. (8) διεπίστωσαν κατὰ τὴν ἔρευνα τῆς κινητικότητος τῶν ἀντισωμάτων σὲ βοοειδῆ μετὰ ἀπὸ πρωτοεμβολιασμό, ὅτι ἡ φύση τῶν ἀντισωμάτων πρωτοεμβολιασθέντων ζώων διαφέρει ἀπὸ αὐτὴν τῶν ἐπανεμβολιασθέντων καὶ ὅτι τὸ μοριακὸ βάρος καὶ τὸ ἠλεκτρικὸ φορτίο τῶν ἀντισωμάτων πρωτοεμβολιασθέντων ζώων εἶναι ὑψηλότερο.

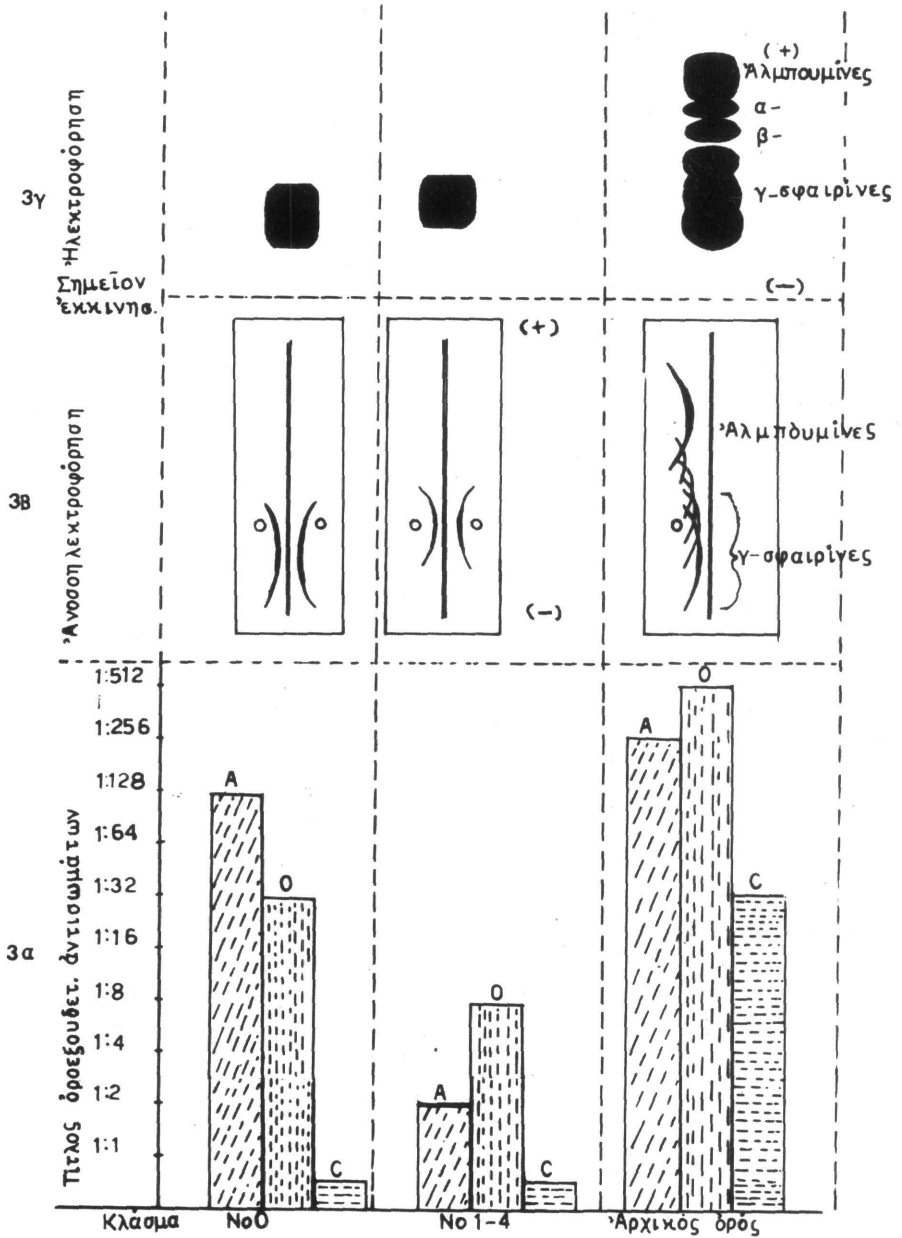
Μὲ τὴν μέθοδο διαχωρισμοῦ τῶν ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ποὺ ἐφαρμόσαμε ἤτοι μὲ τὴν κατακρήμνιση τῶν σφαιρινῶν μὲ διάλυμα θειικοῦ ἀμμωνίου, τὴν ἀφαλάτωση καὶ τὴν χρωματογραφία, ἐπιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμὸς αὐτῶν, ἀλλὰ ἐπέρχεται μιὰ ποσοτικὴ ἀπώλεια σφαιρινῶν.

Μεγάλη ποσότητα σφαιρινῶν κατακρατεῖται στὸ πήκτωμα καὶ ἐκλύεται συνεχῶς καὶ συγχρόνως μὲ τὶς ἀλμπουμίνες.

Ὁ διαχωρισμὸς ὅσο τὸ δυνατόν περισσοτέρων σφαιρινῶν ἀπαιτεῖ ἐπαναχρωματογράφηση τῶν τελευταίων κλασμάτων, ὅπου συνυπάρχει ἀκόμη σημαντικὴ ποσότητα σφαιρινῶν μὲ ἀλμπουμίνες.

ΠΙΝΑΚΑΣ Νο Ι

Δείγματα	Τοπική αντίδραση δέρματος σέ χρόνο					Τίτλος όροεξουδετερωτικων αντισωμάτων		
	0	20'	240'	24 ώρες		A	0	C ₁
1. Πλήρης όρος βοός	0,60 εκ.	0,60 εκ.	0,60 εκ.	0,60 εκ.	πλήρης εξαφάνιση	1:216	1:512	1:32
2. Πλήρης όρος προβάτου	0,60 »	0,60 »	0,60 »	0,60 »	»	—	—	—
3. Κλάσμα όρου No 0	0,60 »	0,60 »	0,60 »	0,60 »	»	1:128	1:32	—
4. Κλάσμα όρου No 1-4	0,60 »	0,60 »	0,60 »	0,60 »	»	1:2	1:8	—
5. Κλάσμα πρωτογάλακτος άγελόδος No 3	0,60 »	2,5 »	2,5 »	2,5 »	όξιδιο	—	—	—
6. Ρυθμ. διάλυμα	0,60 »	0,60 »	0,60 »	0,60 »	πλήρης εξαφάνιση	—	—	—



Σκίτσο No 3

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διά της χρωματογραφίας σέ ανταλλάκτη ανιόντων DEAE A-50 υπερανόσου όρου βοοειδών κατά τοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ όροτύπου Α,Ο,С διαχωρίστηκαν έξουδετερωτικά άντισώματα.

Τό πρώτο κλάσμα (κλάσμα Νο 0) άντιστοιχεῖ ώς πρός τήν ηλεκτροφορική και άνοσοηλεκτροφορική του συμπεριφορά (βραδεία κινητικότητα πρός τήν άνοδο) στήν άνοσοσφαιρίνη IgG₂ και έχει ύψηλότερο τίτλο έξουδετερωτικῶν άντισωμάτων άπό τά επόμενα κλάσματα (κλάσμα Νο1-4) που άντιστοιχούν στήν άνοσοσφαιρίνη IgG₁. Ἀπό τόν υπεράνοσο όρο με τίτλο άντισωμάτων 1:216 1:512 και 1:32 ώς πρός Α,Ο,С άντιστοιχως, στα έξετασθέντα κλάσματα άπομονώθηκαν έξουδετερωτικά άντισώματα μόνο ώς πρός Α και Ο και σέ σχετικά χαμηλό τίτλο.

Τά κλάσματα Νο1-4, που ηλεκτροφορικῶς άντιστοιχούν στήν άνοσοσφαιρίνη IgG₁ άντίθετα πρός τήν IgG₁ τοῦ πρωτογάλακτος, δέν είχαν τήν ιδιότητα τοῦ όμοιοκυτταροτροπισμοῦ.

Ἐκφράζονται οι εύχαριστίες μας στοὺς κ. κ. Δ. Μπρόβα και Χ. Παπποῦ για τίς επιστημονικές συζητήσεις που έγιναν επί τοῦ θέματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fey. H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N. and Grolimund, F. (1967): Zblt. Vet. Med. B, 23, 269
2. Murphy, F. A., J. W. Osebold, and O. Aalund (1965): Arch. Biochem. Biophys., 112, 126.
3. Butler J. E. (1969): J. Dairy Sci 52, 1895.
4. Milstein, C.P. and Feinstein, A. (1968): Biochem. J. 107, 559
5. Fahey, J.L., Wudnerlich, J. and Mishell, R. (1964): J. Exp tl. Med. 120, 243.
6. Groves, M.L., and Gordon W.G. (1967): Biochemistry, 6, 2388.
7. Murphy, F.A. Aalund, O., Osebold, J.W. and Carr ill, E.J. ((1964): Arch. Biophys., 108, 230.
8. Chappuis, G., Moreau Y., and Mackowiak C (1971): European Commission for the control of FMD. Report of the meeting of the research group of the standing texhcnical committee 22-24 October 1971, 93.
9. Pierce, A.E., Feinstein, A. (1965): Immunonology, 8, 106.
10. Rose, J.E., and Roepke, M.H. (1964): Amer. J. Vet. Res. 25, 325
11. Klaus, G.G.B., Bennett, A., and Jones, E.W. (1969): Immunology, 16, 293.

12. Hess, E.L., and Deutsch, H.F. (1948): *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 84.
13. Kickhoefer, B., Hammer, D.K., and Schell, D. (1968): *Z. Physiol. Chem.* 349, 1755.
14. Smith, E.L. (1946): *J. Biol. Chem.* 164, 345.
15. Shemeleva, N.E., and Kulberg, A.Y. (1968): *Biol. I. Med.* 65, 84.
16. Who 1964: *Bull. Wld. Hlth Org.* 30, 447.
17. Johansson S.G.O., and Bennich, M. (1967): *Nobel Symp.* III, 193.
18. Lee, F.I. (1965): *Lancet*, II, 1043.
19. South, M.A. (1968): *Amer. J. Med.* 44, 168.
20. Penhale, W.J. and Christie, G. (1969): *Res. Vet. Sci.*, 10, 493.
21. Voss, H. Henneberg G., Herrmann, R., Pichl, H., Schulterberg, H., and Werner, H., (1967): *Zblt, Bakt. I. Orig.* 203, 249.
22. Scheidegger, J. (1955): *Inst. Arch. Allergy* 7, 103.
23. Pharmacia Fine Chemicals A.B., Uppsala Sweden (1969): *Sephadex - gel filtration in theory and practice.*
24. Hennemann, B. (1969): *Dissertation Berlin.*
25. Καρδάσης, Ι. Παππούς Χ., Μπρόβας Δ., Καραβαλάκης Ι., Σεϊμένης Α., (1964): *Δελτίον Ε.Κ.Ε.* 14, 94.
26. Murphy F.A. J.W. Osebold and O. Aalund (1965): *Arch. Biochem. Biophys.* 112, 126.
27. Rice, Chr. E. and J. Carrieré (1969): *Res. Vet. Sci.*, 10, 188.
28. Murphy, F.A. J.W. Osebold and O. Aalund (1966): *J. Infect. Diseases* 116, 99.