

**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 G<sub>2</sub> and its neutralizing antibodies titre is higher than in the other fractions (Fraction No 1-4) corresponding to Ig G<sub>1</sub>. 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 G<sub>1</sub> unlike Ig G<sub>1</sub> 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 οί ανοσοσφαιρίνες IgG, IgA και IgM<sup>(3, 9)</sup> που ό ρόλος τους στην παθολογία τών βοοειδών δέν είναι ακόμη γνωστός<sup>(3)</sup>. Άντισωματική ιδιότητα έχουν περισσότερες κατηγορίες ανοσφαιρινών<sup>(20)</sup>. Σάν πρώτη ανοσοβιολογική απάντηση τών βοοειδών εμφανίζονται οί ανοσοσφαιρίνες IgM, που δέν παραμένουν για πολύ χρόνο και στή συνέχεια εμφανίζονται οί ανοσοσφαιρίνες IgG<sup>(10)</sup>, που παραμένουν επί πολλούς μήνες<sup>(29)</sup>.

Ή IgG διαχωρίστηκε (μέ τήν χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση, ανοσοηλεκτροφόρηση), σέ IgG<sub>1</sub> και IgG<sub>2</sub><sup>(1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 11, 13, 14)</sup>.

Άνάλογα μέ τό είδος ανταλλάκτη ιόντων και τήν πυκνότητα ιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος, που χρησιμοποιείται για τήν έκλυση του πηκτώματος του ανταλλάκτη ανιόντων, ή IgG<sub>1</sub> διαχωρίζεται από τήν IgG<sub>2</sub>.

Ή IgG<sub>2</sub> που έχει πιό θετικό ηλεκτρικό φορτίο από τήν IgG<sub>1</sub> εκλύεται πρώτη, ενώ ή IgG<sub>1</sub> εκλύεται μετά τήν αύξηση τών ιόντων ή του PH του εκλύτη. Στην ηλεκτροφόρηση και στην ανοσοηλεκτροφόρηση ή IgG<sub>2</sub> κινείται πιό άργά προς τήν άνοδο<sup>(1, 3, 7)</sup>.

Ή διαφοροποίηση μεταξύ τών IgG<sub>1</sub> και IgG<sub>2</sub> γίνεται βάσει τής σύνθεσης τών άμινοξέων και τής αντιγονικότητας που βρίσκεται στο τμήμα Fc του μορίου τής σφαιρίνης<sup>(3, 4, 6, 13, 9, 15)</sup>.

Ή IG<sub>1</sub> συγκεντρώνεται έκλεκτικά στο πρωτόγαλα, συμβάλλει στην παθητική άνοσία τών μόσχων, εκτρέπει τό συμπλήρωμα και εύαισθητοποιεί τό δέρμα τών βοοειδών<sup>(3, 4)</sup>.

Μέ χρωματογραφία σέ ανταλλάκτη ιόντων απομονώθηκε από όρο βοοειδών μετά από μόλυνση μέ Anapl. Marginale, στην όξεία φάση τής νόσου, σέ ώρισμένο κλάσμα, ανοσοσφαιρίνη που έχει τήν ιδιότητα έκτροπής του συμπληρώματος<sup>(2)</sup>.

Άλλοι έρεύνσαν τήν κινητικότητα τών αντισωμάτων σέ βοοειδή μετά από πρωτοεμβολιασμό και επανεμβολιασμό μέ αντιαφθωδικό έμβόλιο<sup>(8)</sup>.

Στήν παρούσα έργασία γίνεται προσπάθεια διαχωρισμού τών έξουδετερωτικών αντισωμάτων του όρου βοοειδών που υπερανοσοποιήθηκαν κατά του ίου του Άφθώδους Πυρετού. Ό διαχωρισμός τών αντισωμάτων έγινε μέ τήν μέθοδο τής χρωματογραφίας σέ ανταλλάκτη ανιόντων (DEAE-Sephadex A-50) και μετά μελετήθηκαν αυτά ως προς τήν ηλεκτροφορική και ανοσοηλεκτροφορική των συμπεριφορά.

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Έμβολιάστηκαν 3 βοοειδή μέ τριδύναμο έμβόλιο Άφθώδους Πυρετού τύπου A (στέλεχος Ξάνθης 1972), O (στέλεχος Πέπλου 1972) και C<sub>1</sub> (στέλεχος C-Detmold). 21 μέρες μετά τον έμβολιασμό μολύνθηκαν τά ζώα μέ όμόλογο ίό τύπου A και O (όχι μέ C<sub>1</sub>) και μετά από 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 από τά τρία βοοειδή για τον διαχωρισμό τών ανοσοσφαιρινών.

## ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ἡ κατακρήμνιση τῶν σφαιρινῶν ἔγινε μὲ διάλυμα θειικοῦ ἀμμωνίου <sup>(21)</sup>. 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 συμπτύκνωση 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, 3H<sub>2</sub>O σὲ 1,5 λίτρο ἀπεσταγμένο νερὸ καὶ ρύθμιση τοῦ pH σὲ 8,6 (μητρ. διάλ.).

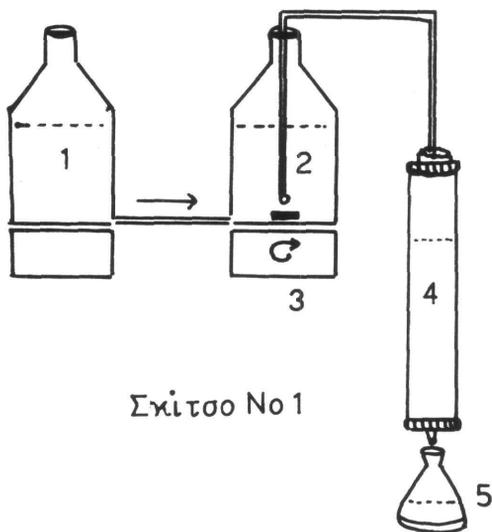
Ἡ ἡλεκτροφόρηση ἔγινε ἐπάνω σὲ μεμβράνες Sepharose III (Cellulose Polyacetate Elektrophoresis Strips Gelman) <sup>(24)</sup> σὲ συσκευὴ Thomas Mod 20, 250 Volt/35'. Ὡς ἡλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε τὸ μητρικὸ διάλυμα DBA ἀραιωμένο 3+2 μὲ ἀπεσταγμένο νερὸ.

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 <sup>(22)</sup>. 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**

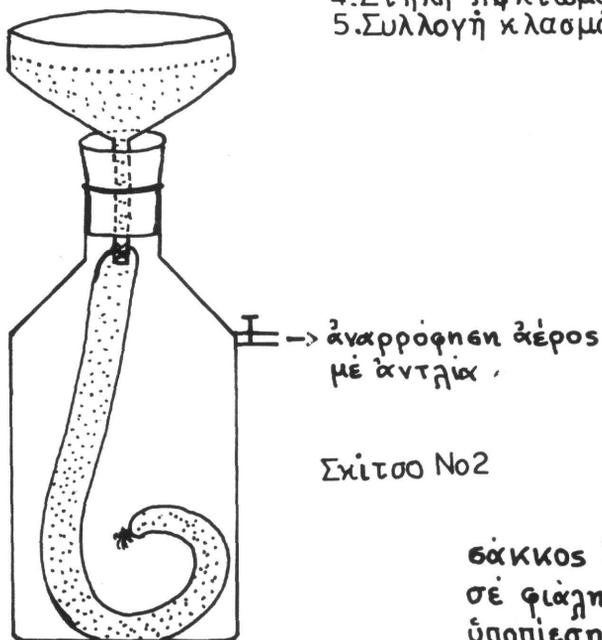
Τὰ κλάσματα πὺ συλλέξαμε ἐλέγχθηκαν γιά ἐξουδετερωτικὰ ἀντισώματα τοῦ ἰοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ <sup>(25)</sup> σὲ κύτταρα IB-RH. Χρησιμοποιήθηκαν 100 TCID<sub>50</sub> ἰοῦ κατὰ κ. ἐκ. Ἡ ἀνάγνωση ἔγινε μετὰ 24 καὶ 48 ὥρες ἀπὸ τοῦ ἐνοφθαλμισμοῦ τῶν κυττάρων μὲ τὸ μίγμα ἰοῦ + ὄρου.

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 IgG<sub>1</sub>.

Παράλληλα πήραμε από μία τυχαία αγελάδα πρωτόγαλα πρώτης ήμέρας, που είναι πλούσιο σε IgG<sub>1</sub><sup>(1)</sup>, 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 <sup>(3)</sup>).

Για την διαφοροποίηση του IgG<sub>1</sub> από τό IgG<sub>2</sub> 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 <sup>(26, 27)</sup>.

### 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, αντιστοιχούν στις σφαιρίνες του πλήρους όρου που δίνουν από την άθοδο προς την άνοδο την πρώτη ταινία στην ήλεκτροφόρηση και τό πρώτο τόξο στην άνοσοηλεκτροφόρηση.

Ή IgG<sub>2</sub> 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 <sup>(1, 3, 7)</sup>.

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 IgG<sub>1</sub> του πλήρους όρου και βρίσκεται άμέσως μετά την IgG<sub>2</sub> προς την άνοδο.

Ή IgG<sub>1</sub> έχει πιό άρνητικό φορτίο από την IgG<sub>2</sub>, 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 <sup>(1)</sup>.

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

Με την χρωματογραφία του πρωτογάλακτος πήραμε επίσης 6 κλάσματα. Ή IgG<sub>1</sub> 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 TCID<sub>50</sub> 1 κ.έκ. τοῦ τίτλου ἀντισωμάτων 1:128, 1:512 καὶ 1:32 ὡς πρὸς A, O καὶ C<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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 (IgG<sub>1</sub>) καὶ μὲ τὶς IgM ἀνοσοσφαιρίνες. Στὰ δύο Peak ποὺ ἔχουν ληφθῆ τὸ πρῶτο εἶχε σφαιρίνες ποὺ κινοῦνται βραδέως πρὸς τὴν ἀνοδο (IgG<sub>2</sub>), ἐνῶ οἱ σφαιρίνες στὸ δεῦτερο Peak ἐκινοῦντο βαθμηδὸν ταχύτερα πρὸς τὴν ἀνοδο. Ἀπὸ ὄρου βοοειδῶν μολυσμένων μὲ *Anaplasma Marginale*, κατὰ τὴν ὀξεία φάση τῆς νόσου, ὁ μέσος ὄρος τῶν IgG τῆς ἐκτροπῆς τοῦ συμπληρώματος ἀπομονώθηκε στὸ κλάσμα 21 ἤτοι στὴν ἀρχὴ τοῦ Peak II<sup>(2)</sup>.

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.

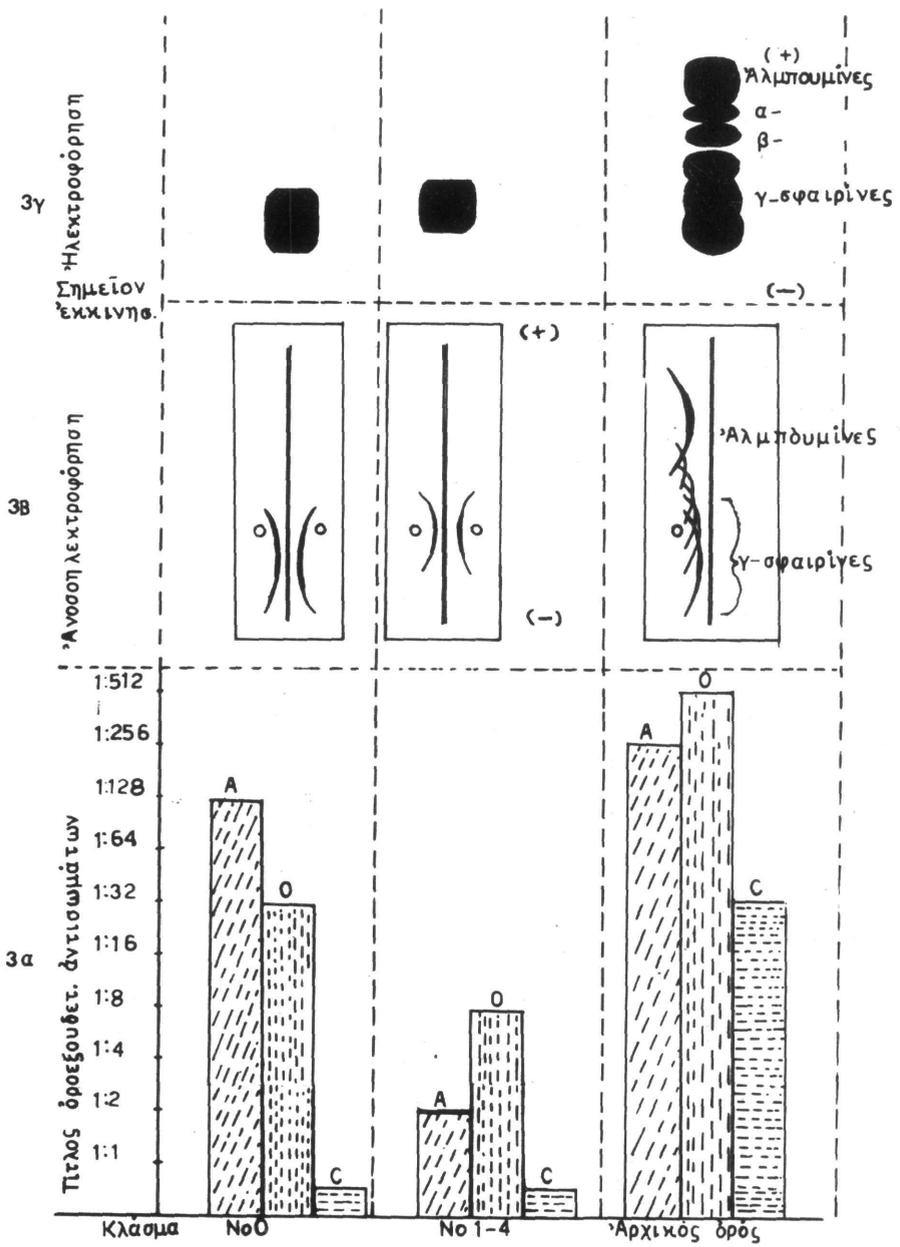
Μὲ τὴν μέθοδο διαχωρισμοῦ τῶν ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ποὺ ἐφαρμόσαμε ἤτοι μὲ τὴν κατακρήμνιση τῶν σφαιρινῶν μὲ διάλυμα θειικοῦ ἀμμωνίου, τὴν ἀφαλάτωση καὶ τὴν χρωματογραφία, ἐπιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμὸς αὐτῶν, ἀλλὰ ἐπέρχεται μιὰ ποσοτικὴ ἀπώλεια σφαιρινῶν.

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 <sub>1</sub>
1. Πλήρης όρος βοός	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 »	»		—	—	—
3. Κλάσμα όρου No 0	0,60 »	0,60 »	0,60 »	»		1:128	1:32	—
4. Κλάσμα όρου No 1-4	0,60 »	0,60 »	0,60 »	»		1:2	1:8	—
5. Κλάσμα πρωτογάλακτος άγελάδος No 3	0,60 »	2,5 »	2,5 »	όξίδιο		—	—	—
6. Ρυθμ. διάλυμα	0,60 »	0,60 »	0,60 »	πλήρης εξαφάνιση		—	—	—



Σκίτος Νο 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.

Τὸ πρῶτο κλάσμα (κλάσμα Νο 0) άντιστοιχεῖ ὡς πρὸς τὴν ἠλεκτροφορική και άνοσοηλεκτροφορική του συμπεριφορά (βραδεία κινητικότητα πρὸς τὴν άνοδο) στὴν άνοσοσφαιρίνη IgG<sub>2</sub> και ἔχει ὕψηλότερο τίτλο έξουδετερωτικῶν άντισωμάτων ἀπὸ τὰ ἐπόμενα κλάσματα (κλάσμα Νο1-4) πὸν άντιστοιχοῦν στὴν άνοσοσφαιρίνη IgG<sub>1</sub>. Ἀπὸ τὸν υπεράνοσο ὀρὸ με τίτλο άντισωμάτων 1:216 1:512 και 1:32 ὡς πρὸς Α,Ο,С άντιστοιχῶς, στὰ έξετασθέντα κλάσματα άπομονώθηκαν έξουδετερωτικά άντισώματα μόνο ὡς πρὸς Α και Ο και σέ σχετικὰ χαμηλὸ τίτλο.

Τὰ κλάσματα Νο1-4, πὸν ἠλεκτροφορικῶς άντιστοιχοῦν στὴν άνοσοσφαιρίνη IgG<sub>1</sub> άντίθετα πρὸς τὴν IgG<sub>1</sub> τοῦ πρωτογάλακτος, δὲν εἶχαν τὴν ιδιότητα τοῦ ὁμοιοκυτταροτροπισμοῦ.

Ἐκφράζονται οἱ εὐχαριστίες μας στοὺς κ. κ. Δ. Μπρόβα και Χ. Παπποῦ για τίς ἐπιστημονικὲς συζητήσεις πὸν ἔγιναν ἐπὶ 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 ell, 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): Immunology, 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.