

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 30, No 1 (1979)

Υπεύθυνος σύμφωνα με το νόμο	
ΙΔΙΟΚΤΗΤΗΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ	
Επιστημονικό Συμβούλιο: άνεγνωρισμένο, άρθρο 5410/19.2.1975	
Προεδρός για το έτος 1979: Κων. Τριλιτάκης	
ΕΚΔΟΣΗ: Έκδίδεται από αμέτρητες πενήτα φορές συντακτικής επιτροπής (Σ.Ε.) μέλων της Ε.Κ.Ε.	
ΥΠΟΝΟΜΙΑ ΣΥΝΤΑΞΕΩΣ: Ο Προεδρός της Σ.Ε. Λουκάς Ευσταθίου, Ζαλοκώστα 30, Χαλάνδρι. Τηλ. 6823459	
Μέλη Συνέδρου: Χ. Παπαδόπουλος, Α. Σαμάνης, Ι. Δημητριάδης, Α. Σαραβάνος	
Στοιχειοθεσία - Έκδοση: ΕΠΙΤΑΛΟΦΟΣ Ε.Π.Ε.	
Αρθροί 12 - 16 - Αθήνα	
Τηλ. 9217513 - 9214820	
ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ: Αθήνα	
Ταχ. Διεύθυνση: Ταχ. θορίξ 546	
Κεντρικό Ταχυδρομείο Αθήνα	
Συνδρομολογία:	
Έτησια έσωτερικού	δρχ. 300
Έτησια εξωτερικού	" 450
Έτησια φοιτητών ή μαθητών	" 100
Έτησια φοιτητών άλλων ειδών	" 150
Τμήμα έκδοσης τευχών	" 75
Τμήματα κλπ.	" 500
Address: P.O.B. 546	
Central Post Office	
Athens - Greece	
Redaction: L. Efstathiou	
Zalokosta 30,	
Halandri	
Greece	
Subscription rates:	
(Foreign Countries)	
\$ U.S.A. 15 per year.	



Δελτίον

ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΠΕΡΙΟΔΟΣ Β
ΤΟΜΟΣ 30
ΤΕΥΧΟΣ 1

Ιανουάριος - Μάρτιος
1979

Bulletin

OF THE HELLENIC
VETERINARY MEDICAL SOCIETY

QUARTERLY
SECOND PERIOD
VOLUME 30
No 1

January - March
1979

Επιτυχίες και επιτεύγματα αποστέλλονται ές: όνομα κ. Άγγ. Παπαδοπούλου, Κτην. Ινστι. Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά όδός 75, Τ.Τ. 303.

Adjuvant activity of saponin and its fractions in foot and mouth disease vaccine

I. A. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

doi: [10.12681/jhvms.21384](https://doi.org/10.12681/jhvms.21384)

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). Adjuvant activity of saponin and its fractions in foot and mouth disease vaccine. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 30(1), 83-95. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21384>

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΑΠΩΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟ ΕΜ- ΒΟΛΙΟ ΑΦΘΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ

Υπό

Ι. Α. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗ*

Με τεχνική συνεργασία Θ. Τελώνη

ADJUVANT ACTIVITY OF SAPONIN AND ITS FRACTIONS IN FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE

By

I.A. DIMITRIADIS

SUMMARY

An assay was made to separate the adjuvant factor of saponin from the hemolytic using the chromatography method.

A 40% saponin solution was passed through Sephadex G-25 column and the first fraction was passed again through Sephadex G-200 column. 2 out of 3 peaks obtained through Sephadex G-200 column were examined. These two peaks were compared with those obtained with Food- and -Mouth Disease vaccine containing a 40% saponin solution and concerning the capacity for hemolysis, necrosis and adjuvant effect of this vaccine.

The 40% saponin solution gives hemolysis of sheep red cells (3% red cells washed and diluted in veronal buffer) when the quantity of saponin is at least 0,078 mg in the solution.

The fraction A and B obtained through G-25 column give hemolysis when the quantities of saponin are 0,156mg and 0,312mg respectively. The fraction II obtained through G-200 column gives hemolysis with 0,156mg while the fraction I does not give hemolysis even with a 10-fold quantity of saponin.

The hemolysis was compared using a 3% suspension of sheep red cells and blood agar (1% agar with 3% sheep red cells). The hemolytic titre of saponin in blood agar is 3 dilutions higher (with dilution logarithm 2) from the one on the suspension of red cells. This led us to think of using this method for detecting smaller quantities of saponin.

The irritation and necrosis degree are different when saponin as a whole and its fraction are used. A 40% saponin solution containing 0,8mg of this substance gives 50% necrosis.

To obtain the same degree of necrosis we need 3, 4mg and 1,13mg of saponin when fractions A and B through G-25 are respectively used. When the fraction II through G-200 is used 3mg of saponin are needed, while the fraction I through the same column does not give any necrosis even used in 10-fold volume.

Neutralizing antibodies titres in guinea pigs after vaccination and infection with the same Foot-and-Mouth Disease virus subtype (A₂₂) are fluctuating and do not correlate with the protection obtained in these animals.

The PD₅₀ in guinea pigs injected with a Food-and-Mouth disease vaccine (subtype A₂₂) without addition of saponin is 0,125mg of vaccine. Adding in this vaccine a 40% saponin solution (that is 0,312mg of saponin per vaccine dose) the PD₅₀ in guinea pigs is 0,062.

Using a lower saponin dilution (that is 0,625mg per vaccine dose) the PD₅₀ in guinea pigs is

* Κτην. Ίνστ. Αφθώδους Πυρετού. Αγία Παρασκευή Αττικής

0,031ml of vaccine.

The addition of fraction I and II though Sephadex G-200 does not have any influence on the immunizing capacity of the vaccine.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σαπωνίνη ($C_{12}H_{22}O_{17}$) είναι φυτικής προελεύσεως γλυκωσίδη, που δεν περιέχει άζωτο. Το σημείο τήξεώς είναι $195^{\circ} C$, είναι διαλυτή στο νερό, αδιάλυτη στο οινόπνευμα, στον αίθρα και στο χλωροφόρμιο (11).

Τα παράγωγα της υδρολύσεως της σαπωνίνης είναι η Sapogenin και η Sucrose (10, 11, 12, 13). Η σαπωνίνη αιμολύει τα έρυθρά αιμοσφαίρια και αν ένοφθαλμιστεί παρεντερικά, προξενεί έρεθισμό μέχρι και νέκρωση των ιστών. Σε συνδιασμό με ένα αντιγόνο, δρᾷ ή σαπωνίνη ως διευκολυντικός παράγοντας στην άνοσοποίηση (4).

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες αξιοποίησεως της σαπωνίνης ως διευκολυντικού παράγοντα με το έμβολιο του Άφθώδους Πυρετού (2, 3, 7, 8, 9, 10, 11).

Το πῶς δρᾷ ή σαπωνίνη διευκολυντικά στην άνοσοποίηση με κάποιο αντιγόνο, δεν διευκρινίστηκε ακόμη. Κατά την άποψη ορισμένων έρευνητών (6), δρᾷ έμμεσα και οί ιδιότητές της να αιμολύει, να έρεθίζει και να διευκολύνει την άνοσοποίηση, δεν έχουν μεταξύ των σχέση. Ό διευκολυντικός παράγοντας της σαπωνίνης παραμένει και μετά την έξουδετέρωση του αιμολυτικού παράγοντα (5).

Οί σαπωνίνες του έμπορίου διαφέρουν μεταξύ των (1,2).

Οί Strobbe και συν. (1974) προσπάθησαν άνεπιτυχῶς να άπομονώσουν τις ιδιότητες αυτές της σαπωνίνης με χρωματογραφία σε πήκτωμα Sephadex G 100. Κατ' αυτούς ό έρεθιστικός και ό διευκολυντικός παράγοντας της σαπωνίνης, κάτω από τις συνθήκες εργασίας των, ήταν πάντα μαζί στο κλάσμα, όπου βρίσκονταν και ό αιμολυτικός παράγοντας.

Ό Dalsgaard (3) προσπάθησε επίσης να διαχωρίσει τις ιδιότητες της σαπωνίνης με χρωματογραφία σε πήκτωμα Sephadex G-200, όπου πήρε τρείς καμπύλες, βάσει μοριακού βάρους. Στην πρώτη καμπύλη άπομονώθηκαν οί μεγαλομοριακές ούσιες χωρίς αιμολυτική ιδιότητα, ενώ στην δεύτερη καμπύλη έκλύθησαν ούσιες με όλα τα χαρακτηριστικά της σαπωνίνης και στην τρίτη καμπύλη έκλύθησαν ούσιες που αιμολύουν τα έρυθρά αιμοσφαίρια, σχηματίζουν άφρο αλλά είναι χωρίς χρώμα. Ένας διαχωρισμός του διευκολυντικού παράγοντα από τις άλλες ιδιότητες δεν έπιτεύχθηκε.

Ό ίδιος ό συγγραφέας (15) κατόρθωσε άργότερα να άπομονώσει από το φυτό QUILLAJA SAPONARIA MOLLINA σε συνδυασμό χρωματογραφίας βάσει μοριακού βάρους και ηλεκτρικού φορτίου των ούσιων, ένα κλάσμα, που άποτελείται από μιά μόνον ούσία και έχει ένισχυτική ιδιότητα σε συνδυασμό με έμβολιο Α.Π.

Έπειδή ή δυνατότητα χρησιμοποίησεως του διευκολυντικού παράγοντα της σαπωνίνης, διαχωρισμένου από τόν αιμολυτικό και κυρίως από τόν έρεθιστικό παράγοντα, θα προσέφερε μεγάλες υπηρεσίες στον έμβολιασμό κατά του άφθώδους πυρετού, γίνεται στην παρούσα εργασία μιά ακόμη προσπάθεια διαχωρισμού των ιδιοτήτων της σαπωνίνης με χρωματογραφία σε πήκτωμα Sephadex G-25 και C-200 όπου ή δυνατότητα διαχωρισμού, πάντα βάσει μοριακού βάρους, είναι πολύ μεγάλη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σαπωνίνη: Χρησιμοποιήθηκε σαπωνίνη της Merck (άριθ. κατ. 7957786) 40% διαλυμένη μέσα σε Tris 0,01 ph 7,6.

Χρωματογραφία: Ό διαχωρισμός της σαπωνίνης έγινε πρώτα με Sephadex G-25 Normal σε στήλη $2,6 \times 45$ εκατ. με όγκο πηκτώματος $2,6 \times 40$ εκατ. Από το διάλυμα σαπωνίνης 40% έναποθετήθηκαν 8 κυβ. εκατ. στην στήλη 9 διαδοχι-

κὲς φορές. Ἀπὸ τὴν στιγμή ἑναποθέσεως τῶν 9 κυβ. ἑκατ. διαλύματος σαπωνίνης στὴν στήλη, ἄρχισε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ὕγρου. Ἐγινε συλλογὴ δύο κλασμάτων ἀνὰ 50 κυβ. ἑκατ. (κλάσμα Α καὶ Β). Τὸ σύνολο τῶν κλασμάτων Α καὶ Β τῶν διαδοχικῶν χρωματογραφιῶν (9×50 κυβ. ἑκατ.) ἀναμείχθηκαν καὶ συμπυκνώθηκαν μὲ Flash Evaporator (Buchner) (στὸ ἐργαστήριο Βιοχημικῶν ἀναλύσεων τοῦ ΚΙΑΠΑΝ καὶ ἐκφράζουμε ἐδῶ τὶς εὐχαριστίες μας) σὲ 36 κυβ. ἑκατ. δηλαδὴ στὸ μισό τῆς συνολικῆς ποσότητος τοῦ ἀρχικοῦ διαλύματος 40% σαπωνίνης ποὺ χρωματογραφήθηκε.

Στὴ συνέχεια χρωματογραφήθηκε τὸ κλάσμα Α τοῦ G25 σὲ Sephadex G-200 (ὄγκος πηκτώματος 2,6×95 ἑκατ.).

Κάθε φορὰ ἑναποθέτονταν στὴν στήλη 5 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25 καὶ ἀμέσως ἄρχιζε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ὕγρου σὲ σωλῆνες ἀνὰ 8-9 κυβ. ἑκατ. (68 σωλῆνες Χ 8-9 κυβ. ἑκατ.).

Ἡ καταγραφὴ τῆς πορείας ἐκλύσεως τῶν κλασμάτων σαπωνίνης ἔγινε σὲ μῆκος κύματος 314,5nm (χρησιμοποιήθηκε τὸ σπεκτροφωτόμετρο τῆς Perkin Elmer τοῦ ΚΙΦΑΔΙΖ καὶ ἐκφράζουμε ἐδῶ τὶς εὐχαριστίες μας). Καταγράφηκαν τρεῖς καμπύλες, δηλαδὴ τὸ ὕγρὸ ποὺ ἐκλύθηκε στοὺς σωλῆνες 16-23 ἔδωσε τὴν καμπύλη Ι, στοὺς σωλῆνες 42-61 τὴν καμπύλη ΙΙ καὶ στοὺς σωλῆνες 63-65 τὴν καμπύλη ΙΙΙ (σχῆμα Νο 1). Στὴ συνέχεια συμπυκνώθηκαν τὰ κλάσματα τῶν ἀντιστοιχῶν καμπύλων σὲ 5 κυβ. ἑκατ.) καὶ ἐξετάστηκαν περαιτέρω.

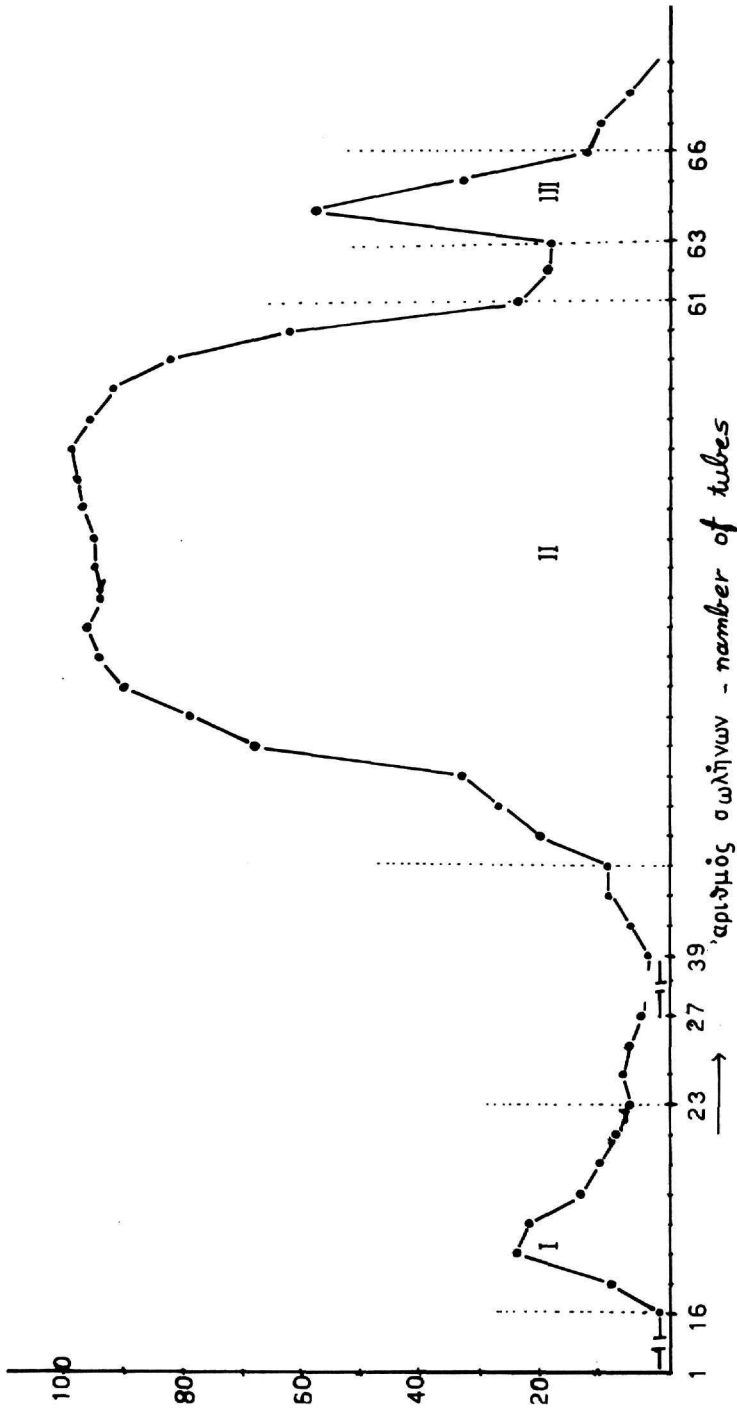
Τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 δὲν χρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200.

Αἰμόλυση: Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μὲ ἐρυθρὰ αἰμοσφαίρια προβάτου πλυμένα καὶ ἀραιωμένα 3% μὲ ρυθμιστικὸ διάλυμα βερονάλης. Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μέσα σὲ σωλῆνες αἰμόλυνσεως ὅπου σὲ 1 κυβ. ἑκατ. 3% ἐρυθρῶν προβάτου προστέθηκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραίωση σαπωνίνης (ἀραιώσεις σαπωνίνης μὲ λογάριθμο τοῦ 2), καὶ ἐπώασθη 2 ὥρες /37° C. Παράλληλα ἔγινε αἰμόλυση τῶν ἰδίων ἀραιώσεων σαπωνίνης μέσα σὲ αἱματοῦχο ἄγαρ. Μέσα σὲ 1% ἄγαρ (τῆς Merck) σὲ θερμοκρασίᾳ 48° C προστέθηκαν ὑπὸ ἀνάδευση 3% ἐρυθρὰ προβάτου πλυμένα (4-5 φορές) μὲ βερονάλη. Τὸ αἱματοῦχο αὐτὸ ἄγαρ μεταγγίστηκε σὲ ὑάλινα τρυβλία σὲ ὀριζόντια θέση καὶ σὲ πάχος περίπου 3 χιλιοστών. Ἀφοῦ ἔπηξε τὸ ἄγαρ, σφραγίστηκε αὐτὸ μὲ τὴν σφραγίδα (κυλινδρικός κόπτης) ἐκκενώθηκε τὸ ἄγαρ ἀπὸ τὶς τρύπες καὶ σ' αὐτὲς μπῆκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραίωση σαπωνίνης. Ἡ ἐπώαση ἔγινε γιὰ 2 ὥρες σὲ κλίβανο τῶν 37° C.

Ἐλεγχος ἐρεθισμοῦ καὶ ἐνισχύσεως τῆς ἀνοσίας (προστασία): Ὁ ἔλεγχος αὐτὸς ἔγινε σὲ λευκὰ ἰνδοχοιρίδια τοῦ Ἰδρύματός μας.

Ἐρεθισμός-νέκρωση: Τὰ κλάσματα τῆς σαπωνίνης ἀραιώθηκαν μὲ φυσιολογικὸ ὁρὸ 1:10 ἕως 1:320 καὶ ἀπὸ κάθε ἀραίωση ἐνοφθαλμίστηκε σὲ δύο σημεία τῆς πλάτης δύο ἰνδοχοιριδίων ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. Ἡ τελικὴ ἀνάγνωση τοῦ ἐρεθισμοῦ καὶ τῆς τοπικῆς νέκρωσης ἔγινε 5 μέρες μετὰ τὸν ἐνοφθαλμισμό (πίνακας 2).

Γιὰ τὸν ἔλεγχο τῆς ἐπίδρασης τῆς σαπωνίνης στὴν ἀνοσία, ἐμβολιάστη-



Σχήμα Νο. 1.: Διαχωρισμός σαπωνίνης με χρωματογραφία σέ πήκτωμα SEPHADEX G-200.
 Fractionation of saponin by chromatography on SEPHADEX G-200.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

TABLE 1

Αιμόλυση σαπωνίνης και κλασμάτων αυτής από χρωματογραφία σε Sephadex G-200

Hemolysis of saponin and its fractions by chromatography on sephadex G-200

Αραιώσεις σαπωνίνης ή κλασμάτων αυτής	Dilution of saponin or its fractions	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
	mg σαπωνίνη/ 0,05 κυβ. εκατ. mg SAP/0,05ccm	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039
Διάλυμα σαπωνίνης 40%		+	+	+	+	+	+	+	+	—
Dilut. of Sapon 40%										
Κλάσμα σαπωνίνης A από G-25		+	+	+	+	+	+	+	—	—
Fraction A by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης B από G-25		+	+	+	+	+	+	—	—	—
Fraction B by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης I από G-200										
Fraction I by G-200										
Κλάσμα σαπωνίνης II από G-200										
Fraction II by G-200		+	+	+	+	+	+	+	—	—

+ = πλήρης αιμόλυση, — = καμία αιμόλυση
+ = Total hemolysis, — = none hemolysis

καμία αιμόλυση σε 10-πλάσιο όγκο

None Hemolysis in 10-fold volume

καν ίνδοχοιρίδια με ένα διδύναμο έμβολιο Αφθώδους Πυρετού (Α-Ξάνθης και Ο-Πέπλου σειράς 282 με Π.Δ.Ι. 0,0625 κυβ. εκατ. εμβολίου ως προς Α-Ξάνθης) χωρίς προσθήκη σαπωνίνης και με προσθήκη σαπωνίνης ή κλασμάτων αυτής (πίνακας 3). Σε κάθε ίνδοχοιρίδιο ένοφθαλμίστηκε 1 κυβ. εκατ. εμβολίου με 0.05 κυβ. εκατ. σαπωνίνης ή κλάσματος αυτής. Τέσσερεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό μολύνθηκαν τα ίνδοχοιρίδια αυτά ένδοδερμικώς στο ένα πέλμα με 10 Αφθ. Πυρετού τύπου, Α-Ξάνθης, προσαρμοσμένο σε ίνδοχοιρίδιο. Η τελική ανάγνωση έγινε 7 ημέρες μετά την μόλυνση βάσει των ανατομοπαθολογικών αλλοιώσεων στα πόδια (πέλμα) και στη γλώσσα.

Ανίχνευση αντισωμάτων: Μετά την τελική ανάγνωση των αποτελεσμάτων, ήτοι 35 μέρες μετά τον εμβολιασμό, τα ίνδοχοιρίδια αφαιμάχθηκαν και ο όρος των εξετάστηκε ως προς ειδικά αντισώματα κατά των τύπων Α-Ξάνθης

ΠΙΝΑΚΑΣ 2
TABLE 2

Τοπική νέκρωση ιστών ίνδοχοιριδίων από σαπωνίνη ή κλασμάτων αυτής*
Local necrosis of guinea pigs tissues by saponin or its fractions*

Hemolytic units Αιμολυτικές μονάδες	mg Σαπωνίνης					
	64	32	16	8	4	2
Αραιώσεις σαπωνίνης ή κλασμάτων Dilut. of sap. or its fract.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Σαπωνίνη 40%						
				++++	(+)---	(+)---
				++++	(+)---	---
				++++	+	---
				---	---	---
sap. 40%						0,80
Κλάσμα σαπ. Α από G-25	++++	+	+	---	---	---
	++++	+	---	---	---	---
	++++	+	---	---	---	---
	++++	---	---	---	---	---
Fraction A by G-25						
	++++	++++	---	---	---	---
Κλάσμα σαπ. B από G-25	++++	++++	+	---	---	---
						3,4

Fraction B by G-25	++++	++++	++++	----	1,13
Κλάσμα σαπ.	++++	++++	++++	----	
I από G-200					
Fraction I by G-200					
Κλάσμα σαπ.	++++	+ +---	-----	-----	
II από G-200	++++	+ +---	-----	-----	
	++++	+ +---	(+)	-----	
Fraction II by G-200	++++	+ +---	-----	-----	3,0

* 'Επεξήγηση: +++++ νέκρωση δέρματος και υποδερμίου ιστού σὲ διάμετρο μεγαλύτερη ἀπὸ 1,5 ἐκατ.

* Legend: Skin and hypodermic tissue necrosis with a diameter bigger than 1,5 cm.

+ +--- Διάμετρος μικρότερη ἀπὸ 1,5 ἐκατ.

Diameter less than 1,5 cm.

+ +--- διάμετρος νέκρωσης 0,5-1 ἐκατ.

diameter 0,5-1 cm

+----- διάμετρος νέκρωσης 0,2-0,5 ἐκατ.

diameter 0,2-0,5 cm

----- καμία λύση δέρματος

Intact skin.

σὲ δεκαπλάσιο ὄγκο (0,5 κυβ. ἐκατ.) καμία νέκρωση
none necrosis in 10 fold volume

ΠΙΝΑΚΑΣ 3
TABLE 3

Ἐπίδραση τῆς σαπωνίνης καὶ τῶν κλασμάτων αὐτῆς στὴν ἀνοσοποίηση τοῦ ἐμβολίου Α.Π.-στὰ ἰνδοχοριθία.
Influence of saponin and its fractions on the immunization of FMD-Vaccine in guinea pigs.

Ἑμβόλιο Ἀφθώδους Πυρετοῦ Foot-and-mouth diseases vaccine		Μὲ σαπωνίνη ἢ κλασμάτων αὐτῆς With saponin or its fractions				Μάρτυρες ἀντιγόνου
Dilution of saponin or its fractions	χωρὶς σαπωνίνη without saponin	Διάλυμα σαπ. 40%	Κλάσμα I G-200		Κλάσμα II G-200	Antigen Controls
		Dilution of saponin 40%	Fract. I G-200	Fract. II G-200		
		1:80 (0,625 mg SAP)	1:160 (0,312 mg SAP)	1:5	1:10	1:40
Λογάριθμος ἀραιώ- σεων ἐμβολίου. Logar. of vaccine dilution	---	---	---	---	---	---
	+++	---	+++	+++	+++	+++
	+++	++--	+++	+++	+++	+++
0,6	---	---	---	---	---	---
1,2	+++	---	+++	+++	+++	+++
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ΠΔ _{I₅₀} /Κυβ. ἑκατ. PDGP ₅₀ /ml	0,125	0,031	0,062	0,125	0,160	0,160

(A₂₂) και Ο-Πέπλου, στην έκτροπή του συμπληρώματος (ΕΣ) και στην όροε-ξουδετέρωση, αφού πρηγουμένως αδρανοποιήθηκαν οι όροι 30' / 56° C.

Για την Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν οι όροι μόνον στην αραίωση 1:20. Η όροεξουδετέρωση έγινε με την μικρομέθοδο (14). Οι όροι αραιώθηκαν με λογάριθμο του 4 από 1:16 έως 1:1024. Από κάθε αραίωση όρου τοποθετήθηκε σε δύο βυθίσματα ανά 0,05 κυβ. εκατ. σ' αυτό προστέθηκε ίσος όγκος αντιγόνου (ιός A₂₂ και Ο-Πέπλου αντίστοιχα) 50-100 DCID₅₀ ανά 0,05 κυβ. εκατ. Μετά από 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκε σε κάθε βύθισμα 0,05 κυβ. εκατ. κύτταρα IBRS (αριθμός κυττάρων $1,3 \times 10^6$ / 1 κυβ. εκατ.) μέσα σε υλικό Eagle με τελικό ποσοστό όρου μόσχου 3,3%. Η πλάκα σκεπάστηκε με διαφανή κόλλα και επώαστηκε 48 ώρες / 37° C. Για να γίνει ή ανάγνωση της όροεξουδετέρωσης, ξεσκεπάστηκαν οι πλάκες άδειάστηκε το περιεχόμενο και προστέθηκε στα βυθίσματα ειδική χρωστική (Kristalviolett 0,1% με 10% φορμόλη 37%). Μετά από 10 λεπτά, ξεπλύθηκαν οι πλάκες και έγινε ή ανάγνωση. Εκεί όπου έδρασε ο ιός, δηλαδή δεν εξουδετερώθηκε ο ιός, δεν σχηματίστηκε ταπήτιο κυττάρων (14).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την χρωματογραφία του διαλύματος σαπωνίνης 40% πρώτα σε πήκτωμα Sephadex G-25, έγινε προσπάθεια χοντρικού διαχωρισμού των ουσιών της σαπωνίνης βάσει μοριακού βάρους. Τα μεγαλομόρια εκλύονται πρώτα. Η δυνατότητα διαχωρισμού ουσιών βάσει μοριακού βάρους στο πήκτωμα G-200 είναι πολύ πιο μεγάλη. Γι' αυτό, μετά την χρωματογραφία σε G-25, το κλάσμα Α, που πρέπει κυρίως να έχει τις περισσότερες μεγαλομοριακές ουσίες επαναχρωματογραφήθηκε σε G-200, όπου πήραμε τρεις καμπύλες.

Τα κλάσματα της πρώτης καμπύλης (I) έχουν μια θολάδα και δεν αφρίζουν. Τα κλάσματα της καμπύλης II έχουν το χαρακτηριστικό χρώμα της σαπωνίνης (ξανθό-καφέ) και αφρίζουν. Τα κλάσματα της τρίτης καμπύλης (III) αφρίζουν ελαφρά και δεν έχουν χρώμα. Τα ενδιάμεσα κλάσματα, που δεν δίνουν καμπύλη, δεν παρουσιάζουν κανένα απ' αυτά τα χαρακτηριστικά.

Οί Strobbe και συνεργ. (1974, 1975) παρατήρησαν, ότι ή διευκολυντική ιδιότητα της σαπωνίνης βρίσκεται στις μεγαλομοριακές ουσίες. Γι' αυτό και ή δική μας έρευνα κατευθύνθηκε στην μελέτη των μεγαλομοριακών ουσιών της σαπωνίνης, ήτοι εκείνων που πήραμε στην καμπύλη I και II από το κλάσμα Α του G-25.

Βασικά, ή εξέταση των κλασμάτων αυτών (I και II) ως προς την αιμόλυση, τόν έρεθισμό και την νέκρωση, έγινε σε σύγκριση με το διάλυμα σαπωνίνης 40% και με τα κλάσματα Α και Β του G-25 (βλέπε πίνακα 1 και 2) ενώ ως προς την επίδραση αυτών στην ανοσοποίηση συγκρίθηκαν μόνον με το διάλυμα σαπωνίνης 40% σε όρισμένη ποσότητα μέσα στο έμβολιο (πίνακας 3).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, ή σαπωνίνη 40% αιμόλυει και στην αραίωση 1:640 ήτοι σε ποσότητα ουσίας σαπωνίνης 0,078 χιλιοστόγραμμα (mg).

Μεταξύ των κλασμάτων Α και Β του G-25, το Α αίμολύει με 0,156mg, ενώ το Β με 0,312 mg ουσίας σαπωνίνης.

Μεταξύ των κλασμάτων Ι και ΙΙ του ηκτηώματος G-200, το πρώτο δέν αίμολύει ούτε σε 10-πλάσιο όγκο, ενώ το δεύτερο (ΙΙ) δίνει σχεδόν την ίδια αίμολυση με το κλάσμα Α του G-25. Δηλαδή, η αίμολυτική ιδιότητα βρίσκεται και στα δύο κλάσματα του G-25, στο G-200 όμως απομονώνεται στα κλάσματα της καμπύλης ΙΙ, ενώ οι μεγαλομοριακές ουσίες που βρίσκονται στην καμπύλη Ι δέν αίμολύουν καθόλου.

Η αίμολυση της σαπωνίνης και των κλασμάτων αυτής, που έγιναν συγκριτικά σε έναίωρημα έρυθρων (3%) και σε αίματούχο άγαρ (1 άγαρ με 3% έρυθρά προβάτου), απέδειξε, ότι ο τίτλος της αίμολυσης στο άγαρ είναι περίπου 3 άραιώσεις (με λογάριθμο του 2) πιο ψηλά. Η μέθοδος αυτή ένδεικνυται ίσως για άνίχνευση μικροποσοτήτων σαπωνίνης. Το κλάσμα Ι του G-200 σε 10-πλάσιο όγκο, δέν αίμόλυσε ούτε στο αίματούχο άγαρ.

Ός προς την έρεθιστικότητα και την νέκρωση του δέρματος και των ύποδορίων ιστών σε ένδοχοιρίδια, όπως φαίνεται στον πίνακα Νο 2, η ποσότητα σαπωνίνης σε χιλιοστόγραμμα κατά δόση σαπωνίνης στο έμβόλιο (0,05 κυβ. έκ. ανά σημείο ένδοφθαλμισμού) κυμαίνεται μεταξύ 0,8-3,4 mg. Στο άρχικό διάλυμα της σαπωνίνης (40%) η ποσότητα σαπωνίνης που προξενεί 50% νέκρωση είναι 0,8 mg, στο κλάσμα Α του G-25 είναι 4-πλάσια εκείνης του διαλύματος σαπωνίνης 40% ήτοι 3,4 mg και ακολουθεί το κλάσμα ΙΙ του G-200 με 3 mg, το κλάσμα Β του G-25 με 1,13 mg. Το πρώτο κλάσμα του G-200 (Κλάσμα Ι) που έχει τα μεγαλομοριακά στοιχεία της σαπωνίνης, δέν προξενεί έρεθισμό και νέκρωση ούτε σε 10-πλάσιο όγκο.

Κατά την άνίχνευση άντισωμάτων έκτροπής του συμπληρώματος ως προς τον ιό Α-Ξάνθης και Ο-Πέπλου, όλοι οι όροι βρέθηκαν στην άραίωση 1:20 άρνητικοί.

Έπίσης στην όροεξουδετέρωση, στην άραίωση 1:16, ήσαν όλοι οι όροι άρνητικοί ως προς τον ιό Ο-Πέπλου, ενώ ως προς τον ιό Α-Ξάνθης, δηλαδή ως προς τον ιό που χρησιμοποιήθηκε για τον έμβολιασμό και την μόλυνση, παρουσιάζουν διακύμανση του τίτλου άντισωμάτων (πίνακας 4).

Το έμβόλιο, χωρίς προσθήκη σαπωνίνης, έχει τίτλο άντισωμάτων 2,10 έως 1,60 που άντιστοιχεί στις άραιώσεις του έμβολίου 1:4-1:64. Το έμβόλιο στην άραίωση 1:16 με προσθήκη 0,625mg σαπωνίνης από τα διαλύματα 40%, όπου προστατεύονται και τα τέσσερα ένδοχοιρίδια, δίνει κατά μέσο όρο χαμηλότερο τίτλο άντισωμάτων από το έμβόλιο στην άραίωση 1:64 και με την ίδια ποσότητα σαπωνίνης όπου γενίκευσαν όλα τα ζώα.

Όπως φαίνεται και στους πίνακες 3 και 4, ο τίτλος άντισωμάτων στην όροεξουδετέρωση, δέν πρέπει να έχει άντιστοιχία με την προστασία στα ένδοχοιρίδια.

Για τον έλεγχο της επίδρασης της σαπωνίνης και των κλασμάτων αυτής στην άνοσοποίηση του έμβολίου, χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα εκείνη σαπωνίνης ή κλάσματος αυτής, που δέν προξενεί έντονη νέκρωση. Από το κλάσμα Ι του G-200 χρησιμοποιήθηκε η άραίωση 1:5 και 1:10 (Πίνακας 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4
TABLE 4

Τίτλος όροξουδετερωτικων αντισωμάτων ως προς τον ιό Α.Π. τύπο Α₂₂ μετά από έμβολιασμό (μέ και χωρίς σαπωνίνη) και μόλυνση.
Title of neutralizing antibodies to FMDV type A₂₂ in guinea pigs after vaccination (with or without saponin) and challenge.

Έμβόλιο 'Αφθώδους Πυρετού

Λογάριθμος αραιώσεων έμβολιού	Χωρίς σαπωνίνη without saponin	Με προσθήκη σαπωνίνης ή κλασμάτων της With saponin or its fractions					Μάρτυρες Controls
		Διάλυμα σαπ. 40% Dilution of sap. 40%	Κλ.ασ. I G-200 Fract. I by G-200	Κλ.ασ. II G-200 Fract. II by G-200			
		1:80	1:60	1:5	1:10	1:40	1:80
0,6	2,10*	2,55	1,80	1,65	2,10	1,95	1,95
1,2	1,64	1,16	1,75	1,75	2,00	2,47	3,0
1,8	1,60	3,00	2,17	2,00	1,54	1,40	2,8

* Λογάριθμος τίτλου όροξουδετερωτικων αντισωμάτων ίνδοχοιριδίων. Ό αριθμός εκφράζει τó μέσο όρο τίτλου 4 ίνδοχοιριδίων.

*Logarithm of title of neutralizing antibodies in guinea pigs. The number is the mean titre from guinea pins.

Όπως φαίνεται (πίνακας 3), το έμβολιο χωρίς προσθήκη σαπωνίνης έχει τίτλο Π.Δ.Ι.₅₀ 0,9 (0,125 κυβ. εκατ. έμβολίου).

Με προσθήκη 0,312mg σαπωνίνης από τα διαλύματα 40% έχει τίτλο ΠΔΙ₅₀ 1,2 (0,062 κυβ. εκατ. έμβολίου) και 1,5 (0,031 κυβ. εκατ. έμβολίου) αντίστοιχως. Τα κλάσματα I και II του G-200, δέν ενισχύουν την άνοσοποιό δύναμη του έμβολίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έγινε προσπάθεια διαχωρισμού του διευκολυντικού παράγοντα της σαπωνίνης από τον αίμολυτικό και έρεθιστικό παράγοντα με την μέθοδο της χρωματογραφίας.

Σαπωνίνη διαλύματος 40% χρωματογραφήθηκε πρώτα σε Sephadex G-25 και το πρώτο κλάσμα από το διάλυμα αυτό επαναχρωματογραφήθηκε σε Sephadex G-200. Από τις τρεις καμπύλες που πήραμε από το Sephadex G-200, εξέτάσαμε μόνον τις δύο πρώτες. Συγκρίθηκαν αυτές με το διάλυμα σαπωνίνης 40% στην αιμόλυση, νέκρωση και στην ενισχυτική των ιδιοτήτων στο έμβολιο άφθώδους πυρετού (τύπος A₂₂).

Το διάλυμα σαπωνίνης 40% αιμολύει αίμοσφαιρία προβάτου (3% έναιώρημα αίμοσφαιρίων πλυμένα και άραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα βερνάλης) στην άραιωση με 0,075 mg τουλάχιστον σαπωνίνη. Το κλάσμα A του G-25 αιμολύει στην άραιωση με 0,156 mg και το κλάσμα B του G-25 στην άραιωση με 0,312 mg σαπωνίνης. Τα κλάσματα της καμπύλης II του G-200 αιμολύουν με 0,156 mg ενώ της καμπύλης I δέν αιμολύουν ούτε με 10-πλάσια ποσότητα.

Η αιμόλυση δοκιμάστηκε συγκριτικά σε 3% έναιώρημα έρυθρων αίμοσφαιρίων προβάτου και σε αίματοϋχο άγαρ (1% άγαρ με 3% αίμοσφαιρία προβάτου). Ο αίμολυτικός τίτλος της σαπωνίνης στο αίματοϋχο άγαρ είναι 3 άραιώσεις ψηλότερα (με λογάριθμο του 2) από εκείνον σε έναιώρημα έρυθρων. Γίνεται σκέψη αξιοποίησεως της μεθόδου στην ανίχνευση μικροποσοτήτων σαπωνίνης.

Ο βαθμός του έρεθισμού και της νέκρωσης διαφέρει μεταξύ της αυτόουσιας σαπωνίνης και των κλασμάτων αυτής. Το διάλυμα σαπωνίνης 40% προξενεί 50% νέκρωση με 0,8 mg, το κλάσμα A του G-25 με 3,4 mg το B του G-25 με 1,13 και το κλάσμα II του G-200 με 3mg ενώ το κλάσμα I του G200 δέν προκαλεί νέκρωση ούτε σε 10-πλάσιο όγκο.

Ο τίτλος όροεξουδετερωτικών αντισωμάτων ίνδοχοιριδίων μετά τον έμβολιασμό και την μόλυνση με τον ίδιο τύπο ιού Αφθώδης Πυρετού (τύπος A₂₂), παρουσιάζει διακυμάνσεις και δέν έχει σχέση με την παρεχόμενη προστασία.

Η Π.Δ.Ι.₅₀ του έμβολίου ως προς τον ιό του Αφθώδους Πυρετού τύπου A₂₂, χωρίς προσθήκη σαπωνίνης είναι 0,125 κυβ. εκατ. έμβολίου, με προσθήκη σαπωνίνης διαλύματος 40% (με 0,312 mg σαπωνίνης κατά δόση έμβολίου) είναι 0,062 και σε χαμηλότερη άραιωση (με 0,625mg σαπωνίνης κατά δόση έμβολίου) είναι 0,062 κυβ. εκατ. έμβολίου.

Ἡ προσθήκη τῶν κλασμάτων I καὶ II τοῦ Shephadex G-200 δὲν ἐπηρεάζει τὴν ἀνοσοποιὸ δύναμη τοῦ ἐμβολίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Charlier, G. et al. (1973): Arch. Exper. Vet. Med. 27, 783—
2. Dalsgaard, K. (1970): Dansk T. Farm. 44, 327—
3. Dalsgaard K. (1972): Bull. Off. Int. Epiz. 77, 1289—
4. Lalouette, P. et al.(1970): C.R. Acad. Sci (Paris) 270,2729—
5. Richou, R. (1964): D' Immunologie (Paris) 28, 49—
6. Richou, R. et al (1967): C.R. Acad. Sci (Pris) 265, 1349—
7. Rivenson, S.(1958): Gac. Vet. B. Aires,20, 116—
8. Scheneider, B. et al (1963): Dtsch Tierarztl Wschr. 70, 482—
9. Strobbe, R. et al. (1964): Bull off int. Epiz. 61, 1059—
10. Strobbe, R. et al.(1974): Arch. Exp. Vet. Med. 28, 385—
11. Strobbe, R. et al. (1976): Arch. Exp. Vet. Med. 30, 173—
12. Vochten, R. et al. (1968): J. Pharm. Belg. 42, 213—
13. Vochten, R. et al (1971): Verhandelingen van de koninklijke vlaamse Academie voor wetenschappen, Letteren en Schone Kunstaen van Belgie 118, 146—
14. Rweyemamu, M.M. et al. (1978): J. Hyg. Camb. 81, 107—
15. Daisgaard, K. (1974) Arch. Ges. Virusforsch 44, 243—