

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 30, No 1 (1979)

Υπεύθυνοι σύμφωνα με το νόμο

ΙΔΙΟΚΤΗΤΗΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ
ΕΤΑΙΡΕΙΑ

Επιστημονικό Συμβούλιο ανεγνωρισμένο, άρ.πρ. απόφ. 5410/19.2.1975
Προεδρεύουσα: Αθήναι.

Πρόεδρος για το έτος 1979:
Κων. Τριλιτάξης

ΕΚΛΟΓΗ: Εκδίδεται υπό αίρεση πενήτα μέλους συντακτικής επιτροπής (Σ.Ε.) μελών της Ε.Κ.Ε.

ΥΠ/ΝΟΣ ΣΥΝΤΑΞΕΙΣ: Ο Πρόεδρος της Σ.Ε. Λουκάς Εύσταθίου, Ζαλοκώστα 30, Χαλάνδρι. Τηλ. 6823459

Μέλη Συνχής Έπ.:
Χ. Παππούς
Α. Σεμένης
Ι. Δημητριάδης
Α. Σαραβάνος

Στοιχειοθεσία - Έκδοση: ΕΠΤΑΛΟΦΟΣ Ε.Π.Ε.
Άρσεντού 12 - 16 - Αθήναι
Τηλ. 9217513 - 9214820
ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ: Αθήναι

Ταχ. Διεύθυνση:
Ταχ. θορίς 546
Κεντρικό Ταχυδρομείο
Αθήναι


Συνδρομιαί:

Έτησια έσωτερικού	δρχ.	300
Έτησια έξωτερικού	"	450
Έτησια φοιτητών ήμεδαπής	"	100
Έτησια φοιτητών αλλοδαπής	"	150
Τμήτ έκαστου τεύχους	"	75
Ίδρύματα κλπ.	"	500

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

Redaction: L. Ffstathiou
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

Έπιταγής και έμβόλια αποστέλλονται έξ' όνόματι κ. Άγγ. Παπαδοπούλου, Κτην. Ινστ. Υγιανής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τερά 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 Ι. Α. (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 small 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 (A_{22}) are fluctuating and do not correlate with the protection obtained in these animals.

The PD_{50} in guinea pigs injected with a Food-and-Mouth disease vaccine (subtype A_{22}) 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 PD_{50} in guinea pigs is 0,062.

Using a lower saponin dilution (that is 0,625mg per vaccine dose) the PD_{50} 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

Ἡ σαπωνίνη ($C_{32}H_{52}O_{17}$) εἶναι φυτικῆς προελεύσεως γλυκωσίδη, πού δὲν περιέχει ἄζωτο. Τό σημεῖο τήξεως εἶναι $195^{\circ} C$, εἶναι διαλυτὴ στό νερό, ἀδιάλυτη στό οἰνόπνευμα, στόν αἰθέρα καί στό χλωροφόρμιο (11).

Τὰ παράγωγα τῆς ὑδρολύσεως τῆς σαπωνίνης εἶναι ἡ Sapogenin καί ἡ Sucrose (10, 11, 12, 13). Ἡ σαπωνίνη αἰμολύει τὰ ἐρυθρὰ αἰμοσφαίρια καί ἂν ἐνοφθαλμιστεῖ παρεντερικά, προξενεῖ ἐρεθισμό μέχρι καί νέκρωση τῶν ἰσθῶν. Σέ συνδιασμό μὲ ἓνα ἀντιγόνο, δρᾷ ἡ σαπωνίνη ὡς διευκολυντικός παράγοντας στήν ἀνοσοποίηση (4).

Ἐχουν γίνεи πολλῆς προσπάθειες ἀξιοποιήσεως τῆς σαπωνίνης ὡς διευκολυντικοῦ παράγοντα μὲ τὸ ἐμβόλιο τοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ (2, 3, 7, 8, 9, 10, 11).

Τὸ πὼς δρᾷ ἡ σαπωνίνη διευκολυντικά στήν ἀνοσοποίηση μὲ κάποιο ἀντιγόνο, δὲν διευκρινίστηκε ἀκόμη. Κατὰ τὴν ἀποψη ὀρισμένων ἐρευνητῶν (6), δρᾷ ἔμμεσα καί οἱ ἰδιότητές της νὰ αἰμολύει, νὰ ἐρεθίζει καί νὰ διευκολύνει τὴν ἀνοσοποίηση, δὲν ἔχουν μεταξὺ των σχέση. Ὁ διευκολυντικός παράγοντας τῆς σαπωνίνης παραμένει καί μετὰ τὴν ἐξουδετέρωση τοῦ αἰμολυτικοῦ παράγοντα (5).

Οἱ σαπωνίνες τοῦ ἐμπορίου διαφέρουν μεταξὺ των (1,2).

Οἱ Strobbe καί συν. (1974) προσπάθησαν ἀνεπιτυχῶς νὰ ἀπομονώσουν τὶς ἰδιότητες αὐτές τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G 100. Κατ' αὐτοὺς ὁ ἐρεθιστικός καί ὁ διευκολυντικός παράγοντας τῆς σαπωνίνης, κάτω ἀπὸ τὶς συνθήκες ἐργασίας των, ἦταν πάντα μαζί στό κλάσμα, ὅπου βρίσκονταν καί ὁ αἰμολυτικός παράγοντας.

Ὁ Dalsgaard (3) προσπάθησε ἐπίσης νὰ διαχωρίσει τὶς ἰδιότητες τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G-200, ὅπου πῆρε τρεῖς καμπύλες, βάσει μοριακοῦ βάρους. Στὴν πρώτη καμπύλη ἀπομονώθηκαν οἱ μεγαλομοριακῆς οὐσίες χωρὶς αἰμολυτικὴ ἰδιότητα, ἐνῶ στὴν δευτέρη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες μὲ ὅλα τὰ χαρακτηριστικὰ τῆς σαπωνίνης καί στὴν τρίτη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες πού αἰμολύουν τὰ ἐρυθρὰ αἰμοσφαίρια, σχηματίζον ἀφρό ἀλλὰ εἶναι χωρὶς χρῶμα. Ἐνας διαχωρισμὸς τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα ἀπὸ τὶς ἄλλες ἰδιότητες δὲν ἐπιτεύχθηκε.

Ὁ ἴδιος ὁ συγγραφεὺς (15) κατόρθωσε ἀργότερα νὰ ἀπομονώσει ἀπὸ τὸ φυτὸ QUILLAJA SAPONARIA MOLLINA σὲ συνδυασμὸ χρωματογραφίας βάσει μοριακοῦ βάρους καί ἠλεκτρικοῦ φορτίου τῶν οὐσιῶν, ἓνα κλάσμα, πού ἀποτελεῖται ἀπὸ μὴ μόνον οὐσία καί ἔχει ἐνισχυτικὴ ἰδιότητα σὲ συνδυασμὸ μὲ ἐμβόλιο Α.Π.

Ἐπειδὴ ἡ δυνατότητα χρησιμοποίησεως τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα τῆς σαπωνίνης, διαχωρισμένου ἀπὸ τὸν αἰμολυτικὸ καί κυρίως ἀπὸ τὸν ἐρεθιστικὸ παράγοντα, θὰ προσέφερε μεγάλες ὑπηρεσίες στόν ἐμβολιασμὸ κατὰ τοῦ ἀφθώδους πυρετοῦ, γίνεται στὴν παρούσα ἐργασία μὴ ἀκόμη προσπάθεια διαχωρισμοῦ τῶν ἰδιοτήτων τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G-25 καί C-200 ὅπου ἡ δυνατότητα διαχωρισμοῦ, πάντα βάσει μοριακοῦ βάρους, εἶναι πολὺ μεγάλη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σαπωνίνη: Χρησιμοποιήθηκε σαπωνίνη τῆς Merck (ἀριθ. κατ. 7957786) 40% διαλυμένη μέσα σὲ Tris 0,01 ph 7,6.

Χρωματογραφία: Ὁ διαχωρισμὸς τῆς σαπωνίνης ἔγινε πρῶτα μὲ Sephadex G-25 Normal σὲ στήλη $2,6 \times 45$ ἑκατ. μὲ ὄγκο πηκτώματος $2,6 \times 40$ ἑκατ. Ἀπὸ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% ἐναποθετήθηκαν 8 κυβ. ἑκατ. στὴν στήλη 9 διαδοχι-

κές φορές. Ἀπὸ τὴν στιγμή ἑναποθέσεως τῶν 9 κυβ. ἑκατ. διαλύματος σαπωνίνης στὴν στήλη, ἄρχισε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ὕγρου. Ἐγίνε 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) (στοῦ ἐργαστήριο Βιοχημικῶν ἀναλύσεων τοῦ ΚΙΑΠΑΝ καὶ ἐκφράζουμε ἐδῶ τὶς εὐχαριστίες μας) σὲ 36 κυβ. ἑκατ. δηλαδὴ στοῦ μισοῦ 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 X 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.

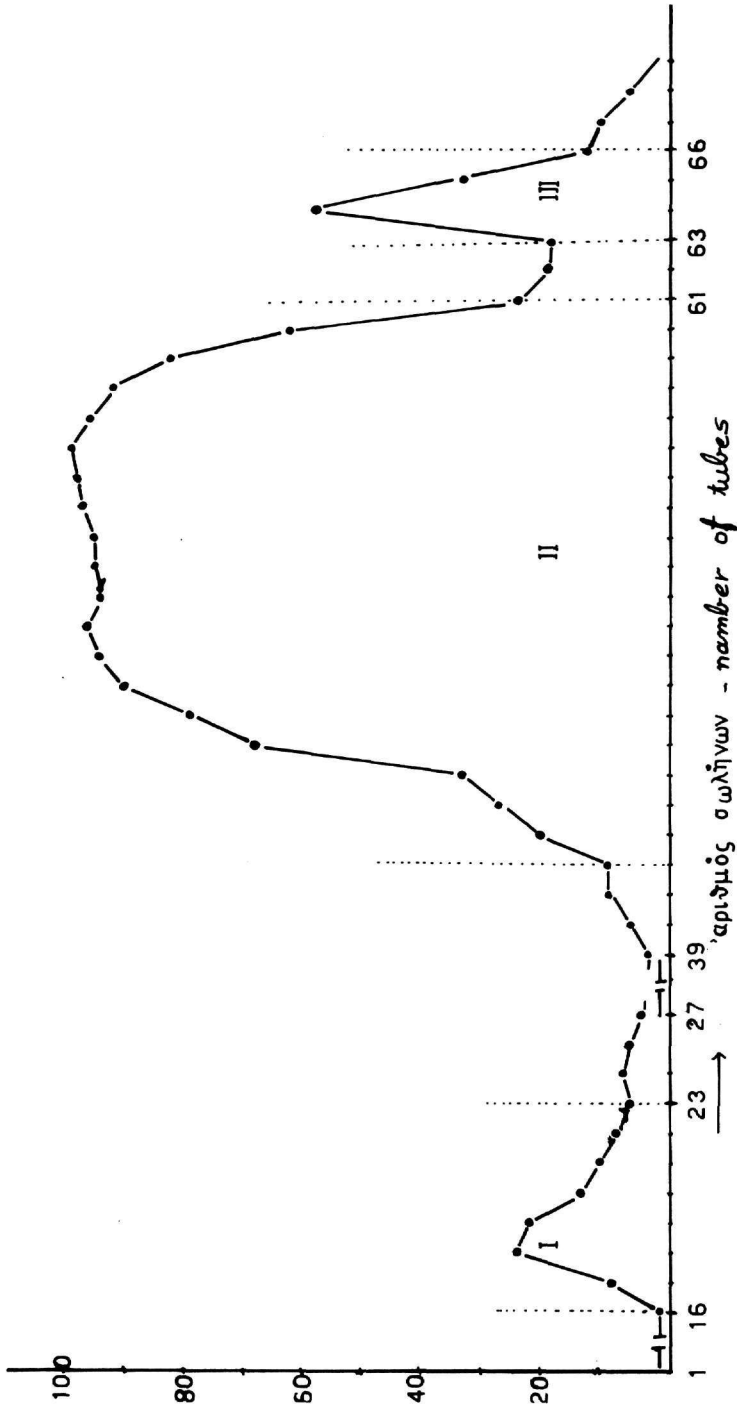
Τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 δὲν χρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200.

Αἰμόλυση: Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μὲ ἐρυθρὰ αἰμοσφαίρια προβάτου πλυμένα καὶ ἀραιωμένα 3% μὲ ρυθμιστικὸ διάλυμα βερονάλης. Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μέσα σὲ σωλῆνες αἰμόλυσεως 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 χιλιοστῶν. Ἀφοῦ ἐπηξε τὸ ἄγαρ, σφραγίστηκε αὐτὸ μὲ τὴν σφραγίδα (κυλινδρικός κόπτης) ἐκκενώθηκε τὸ ἄγαρ ἀπὸ τὶς τρύπες καὶ σ' αὐτὲς μῆκε 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 ὄρὸ 1:10 ἕως 1:320 καὶ ἀπὸ κάθε ἀραίωση ἐνοφθαλμίστηκε σὲ δύο σημεῖα 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 ἔλεγχὸ τῆς ἐπίδρασης τῆς σαπωνίνης στὴν ἀνοσία, ἐμβολιάστη-



Σχήμα Νο. 1: Διαχωρισμός σαπωνίνης με χρωματογραφία σε 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

Ἀραιώσεις σαπωνίνης ἢ κλασμάτων αὐτῆς	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 σαπωνίνης/ 0,05 κυβ. ἑκατ. mg SAP/0,05ccm	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078
Διάλυμα σαπωνίνης 40%		+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dilut. of Sapon 40%										
Κλάσμα σαπωνίνης A ἀπὸ G-25		+	+	+	+	+	+	+	-	-
Fraction A by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης B ἀπὸ G-25		+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fraction B by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης I ἀπὸ G-200										
Fraction I by G-200										
Κλάσμα σαπωνίνης II ἀπὸ G-200		+	+	+	+	+	+	+	-	-
Fraction II by G-200										

+ = πλήρης αἰμόλυση, - = καμία αἰμόλυση

+ = Total hemolysis, - = none hemolysis

καμία αἰμόλυση σὲ 10-πλάσιο ὄγκο

None Hemolysis in 10-fold volume

καν ἰνδοχοιρίδια μὲ ἓνα διδύναμο ἐμβόλιο Ἄφθώδους Πυρετοῦ (Α-Ξάνθης καὶ 0-Πέπλου σειρᾶς 282 μὲ Π.Δ.Ι. 0,0625 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου ὡς πρὸς Α-Ξάνθης) χωρὶς προσθήκη σαπωνίνης καὶ μὲ προσθήκη σαπωνίνης ἢ κλασμάτων αὐτῆς (πίνακας 3). Σὲ κάθε ἰνδοχοιρίδιο ἐνοφθαλμίστηκε 1 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου μὲ 0.05 κυβ. ἑκατ. σαπωνίνης ἢ κλάσματος αὐτῆς. Τέσσερις ἐβδομάδες μετὰ τὸν ἐμβολιασμό μολύνθηκαν τὰ ἰνδοχοιρίδια αὐτὰ ἐνδοδερμικῶς στὸ ἓνα πέλμα μὲ τὸ Ἄφθ. Πυρετοῦ τύπου, Α-Ξάνθης, προσαρμοσμένο σὲ ἰνδοχοιρίδιο. Ἡ τελικὴ ἀνάγνωση ἔγινε 7 ἡμέρες μετὰ τὴν μόλυνση βάσει τῶν ἀνατομοπαθολογικῶν ἀλλοιώσεων στὰ πόδια (πέλμα) καὶ στὴ γλώσσα.

Ἀνίχνευση ἀντισωμάτων: Μετὰ τὴν τελικὴ ἀνάγνωση τῶν ἀποτελεσμάτων, ἦτοι 35 μέρες μετὰ τὸν ἐμβολιασμό, τὰ ἰνδοχοιρίδια ἀφαιμάχθηκαν καὶ ὁ ὅρος τῶν ἐξετάσθηκε ὡς πρὸς εἰδικὰ ἀντισώματα κατὰ τῶν τύπων Α-Ξάνθης

ΠΙΝΑΚΑΣ 2
TABLE 2

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

Hemolytic units Αιμολυτικές μονάδες	64	32	16	8	4	2	mg Σαπωνίνης
Αραιώσεις σαπωνίνης ή κλασμάτων Dilut. of sap. or its fract.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	κατά δόση με 50% νέκρωση mg sap/dosis/50% necrosis
Σαπωνίνη 40%			++++	++++	(+)	(+)	
sap. 40%			++++	++++	(+)	(+)	0,80
Κλάσμα σαπ. Α από G-25	++++	+	++	---	---	---	
Fraction A by G-25	++++	+	++	---	---	---	3,4
Κλάσμα σαπ. B από G-25	++++	++++	++++	+	+	+	

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 ύποδροριού ιστού σὲ διάμετρο μεγαλύτερη ἀπὸ 1,5 ἑκατ.

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

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

Diameter less than 1,5 cm.

+ +---- διάμετρος νέκρωσης 0,5-1 ἑκατ.

diameter 0,5-1 cm

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

diameter 0,2-0,5 cm

----- καμία λύση δέρματος

Intact skin.

σὲ δεκαπλάσιο ὄγκο (0,5 κυβ. ἑκατ.) καμία νέκρωση

none necrosis in 10 fold volume

ΠΙΝΑΚΑΣ 3
TABLE 3

'Επίδραση τής σαπωνίνης και τών κλασμάτων αυτής στην άνοσοποίηση του έμβολίου Α.Π.-στά ίνδοχοφίδια.
Influence of saponin and its fractions on the immunization of FMD-Vaccine in guinea pigs.

'Εμβόλιο 'Αφθώδους Πυρετού
Foot-and-mouth disease vaccine

Dilution of saponin or its fractions	χωρίς σαπωνίνη without saponin	Με σαπωνίνη ή κλάσμάτων αυτής With saponin or its fractions		Μάρτυρες αντιγόνου Antigen Controls			
		Διάλυμα σαπ. 40% Dilution of saponin 40%	Κλάσμα I G-200 Fract. I G-200		Κλάσμα II G-200 Fract. II G-200		
'Αραιώσεις σαπ. ή κλασμ.		1:80 (0,625 mg SAP)	1:5	1:10	1:40	1:80	
Λογάριθμος άραιώ- σεων έμβολίου. Logar. of vaccine dilution							
0,6	---	---	---	---	---	---	+++++
1,2	+++	---	+++	+++	+++	+++	+++
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ΠΔ _{I₅₀} /Κυβ. έκκατ. PDGP ₅₀ /ml	0,125	0,031	0,125	0,160	0,125	0,160	0,160

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

Για την Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν οι όροι μόνον στην άραιωση 1:20. Η όροεξουδετέρωση έγινε με την μικρομέθοδο (14). Οι όροι άραιώθηκαν με λογάριθμο του 4 από 1:16 έως 1:1024. Από κάθε άραιωση 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 (άριθμός κυττάρων 1,3 × 10⁶/1 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, τον 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 άνοσοποίηση συγκρίθηκαν μόνον με το διάλυμα σαπωνίνης 40% σε όρισμένη ποσότητα μέσα στο έμβόλιο (πίνακας 3).

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

Μεταξύ τῶν κλασμάτων Α καὶ Β τοῦ G-25, τὸ Α αἰμολύει μὲ 0,156mg, ἐνῶ τὸ Β μὲ 0,312 mg οὐσίας σαπωνίνης.

Μεταξύ τῶν κλασμάτων Ι καὶ ΙΙ τοῦ πηκτώματος G-200, τὸ πρῶτο δὲν αἰμολύει οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὄγκο, ἐνῶ τὸ δεῦτερο (ΙΙ) δίνει σχεδὸν τὴν ἴδια αἰμολύση μὲ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25. Δηλαδή, ἡ αἰμολυτικὴ ἰδιότητα βρίσκεται καὶ στὰ δύο κλάσματα τοῦ G-25, στὸ G-200 δμως ἀπομονώνεται στὰ κλάσματα τῆς καμπύλης ΙΙ, ἐνῶ οἱ μεγαλομοριακὲς οὐσίες ποὺ βρίσκονται στὴν καμπύλη Ι δὲν αἰμολύουν καθόλου.

Ἡ αἰμολύση τῆς σαπωνίνης καὶ τῶν κλασμάτων αὐτῆς, ποὺ ἔγιναν συγκριτικὰ σὲ ἐναιώρημα ἐρυθρῶν (3%) καὶ σὲ αἱματοῦχο ἄγαρ (1 ἄγαρ μὲ 3% ἐρυθρὰ προβάτου), ἀπέδειξε, ὅτι ὁ τίτλος τῆς αἰμολύσης στὸ ἄγαρ εἶναι περίπου 3 ἀραιώσεις (μὲ λογάριθμο τοῦ 2) πιὸ ψηλά. Ἡ μέθοδος αὐτὴ ἐνδείκνυται ἴσως γιὰ ἀνίχνευση μικροποσοτήτων σαπωνίνης. Τὸ κλάσμα Ι τοῦ G-200 σὲ 10-πλάσιο ὄγκο, δὲν αἰμόλυσε οὔτε στὸ αἱματοῦχο ἄγαρ.

Ὡς πρὸς τὴν ἐρεθιστικὴτητα καὶ τὴν νέκρωση τοῦ δέρματος καὶ τῶν ὑποδορίων ἰσθῶν σὲ ἰνδοχοιρίδια, ὅπως φαίνεται στὸν πίνακα Νο 2, ἡ ποσότητα σαπωνίνης σὲ χιλιοστόγραμμα κατὰ δόση σαπωνίνης στὸ ἐμβόλιο (0,05 κυβ. ἐκατ. ἀνά σημεῖο ἐνοφθαλμισμού) κυμαίνεται μεταξύ 0,8-3,4 mg. Στὸ ἀρχικὸ διάλυμα τῆς σαπωνίνης (40%) ἡ ποσότητα σαπωνίνης ποὺ προξενεῖ 50% νέκρωση εἶναι 0,8 mg, στὸ κλάσμα Α τοῦ G-25 εἶναι 4-πλάσια ἐκείνης τοῦ διαλύματος σαπωνίνης 40% ἤτοι 3,4 mg καὶ ἀκολουθεῖ τὸ κλάσμα ΙΙ τοῦ G-200 μὲ 3 mg, τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 μὲ 1,13 mg. Τὸ πρῶτο κλάσμα τοῦ G-200 (Κλάσμα Ι) ποὺ ἔχει τὰ μεγαλομοριακὰ στοιχεῖα τῆς σαπωνίνης, δὲν προξενεῖ ἐρεθισμό καὶ νέκρωση οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὄγκο.

Κατὰ τὴν ἀνίχνευση ἀντισωμάτων ἐκτροπῆς τοῦ συμπληρώματος ὡς πρὸς τὸν ἰὸ Α-Ξάνθης καὶ 0-Πέπλου, ὄλοι οἱ ὀροι βρέθηκαν στὴν ἀραίωση 1:20 ἀρνητικοί.

Ἐπίσης στὴν ὀροεξουδετέρωση, στὴν ἀραίωση 1:16, ἦσαν ὄλοι οἱ ὀροι ἀρνητικοί ὡς πρὸς τὸν ἰὸ 0-Πέπλου, ἐνῶ ὡς πρὸς τὸν ἰὸ Α-Ξάνθης, δηλαδή ὡς πρὸς τὸν ἰὸ ποὺ χρησιμοποιήθηκε γιὰ τὸν ἐμβολιασμό καὶ τὴν μόλυνση, παρουσιάζουν διακύμανση τοῦ τίτλου ἀντισωμάτων (πίνακας 4).

Τὸ ἐμβόλιο, χωρὶς προσθήκη σαπωνίνης, ἔχει τίτλο ἀντισωμάτων 2,10 ἕως 1,60 ποὺ ἀντιστοιχεῖ στὶς ἀραιώσεις τοῦ ἐμβολίου 1:4-1:64. Τὸ ἐμβόλιο στὴν ἀραίωση 1:16 μὲ προσθήκη 0,625mg σαπωνίνης ἀπὸ τὰ διαλύματα 40%, ὅπου προστατεύονται καὶ τὰ τέσσερα ἰνδοχοιρίδια, δίνει κατὰ μέσο ὄρο χαμηλότερο τίτλο ἀντισωμάτων ἀπὸ τὸ ἐμβόλιο στὴν ἀραίωση 1:64 καὶ μὲ τὴν ἴδια ποσότητα σαπωνίνης ὅπου γενίκευσαν ὄλα τὰ ζῶα.

Ὅπως φαίνεται καὶ στοὺς πίνακες 3 καὶ 4, ὁ τίτλος ἀντισωμάτων στὴν ὀροεξουδετέρωση, δὲν πρέπει νὰ ἔχει ἀντιστοιχία μὲ τὴν προστασία στὰ ἰνδοχοιρίδια.

Γιὰ τὸν ἔλεγχο τῆς ἐπίδρασης τῆς σαπωνίνης καὶ τῶν κλασμάτων αὐτῆς στὴν ἀνοσοποίηση τοῦ ἐμβολίου, χρησιμοποιήθηκε ἡ ποσότητα ἐκείνη σαπωνίνης ἢ κλάσματος αὐτῆς, ποὺ δὲν προξενεῖ ἔντονη νέκρωση. Ἀπὸ τὸ κλάσμα Ι τοῦ G-200 χρησιμοποιήθηκε ἡ ἀραίωση 1:5 καὶ 1:10 (Πίνακας 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4
TABLE 4

Τίτλος οροξυδερματικών άντισωμάτων ως προς τον ιό Α.Π. τύπο A₂₂ 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 Άφώδους Πυρετού

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

* Λογάριθμος τίτλου οροξυδερματικών άντισωμάτων ίνδοχοριδίων. Ο άριθμός εκφράζει τó μέσο όρο τίτλου 4 ίνδοχοριδίων.

*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 τὰ 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 τὸ πρώτο κλάσμα από τὸ διάλυμα αυτό έπαναχρωματογραφήθηκε σε Sephadex G-200. Από τις τρεις καμπύλες που πήραμε από τὸ Sephadex G-200, εξετάσαμε μόνον τις δύο πρώτες. Συγκρίθηκαν αυτές με τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% στην αιμόλυση, νέκρωση και στην ενισχυτική των ιδιότητα στο έμβολιο άφθώδους πυρετού (τύπος A₂₂).

Τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% αιμολύει αίμοσφαιρία προβάτου (3% έναιώρημα αίμοσφαιρίων πλυμένα και άρραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα βερονάλης) στην άρραίωση με 0,075 mg τουλάχιστον σαπωνίνη. Τὸ κλάσμα A του G-25 αιμολύει στην άρραίωση με 0,156 mg και τὸ κλάσμα B του G-25 στην άρραίωση με 0,312 mg σαπωνίνης. Τα κλάσματα της καμπύλης II του G-200 αιμολύουν με 0,156 mg ενώ της καμπύλης I δέν αιμολύουν οὔτε με 10-πλάσια ποσότητα.

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

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

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

Η Π.Δ.Ι.₅₀ του έμβολίου ως πρὸς τὸν ίδ 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 άρραίωση (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—