

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 γιά τό έτος 1979:
Κων. Τριλιτάξης

ΕΚΔΟΤΗΣ: Έκδίδεται υπό άμεση πενταμελούς συντακτικής επιτροπής (Σ.Ε.) μέλών 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 - Έκτύπωση:
ΕΠΙΤΑΛΟΦΟΣ Ε.Π.Ε.

Άρσρητού 12 - 16 - Αθήναι
Τηλ. 9217513 - 9214820
ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Αθήναι

Ταχ. Διεύθυνση:
Ταχ. θορίς 546
Κεντρικό Ταχυδρομείο
Αθήναι


Συνδρομαί:

Έτησια έσωτερικού	δρχ.	300
Έτησια έξωτερικού	"	450
Έτησια φοιτητών ήμβιασης	"	100
Έτησια φοιτητών άλλοδισπής	"	150
Τμή ήμισυ έτους	"	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 ήμβήματα άποστέλλονται έξ' όνόματι κ. Άγγ. Παπαδοπούλου, Κτην. Ίνστ. Υγιανής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ίερά 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. Άγία Παρασκευή Άττικής

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 ($C_{32}H_{52}O_{17}$) είναι φυτικής προελεύσεως γλυκωσίδη, που δεν περιέχει άζωτο. Το σημείο τήξεως είναι $195^{\circ} C$, είναι διαλυτή στο νερό, αδιάλυτη στο οινόπνευμα, στον αέρα 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 αντίγονο, δρᾶ ή σαπωνίνη ως διευκολυντικός παράγοντας στην άνοσοποίηση (4).

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

Το πῶς δρᾶ ή σαπωνίνη διευκολυντικά στην άνοσοποίηση με κάποιο αντίγονο, δεν διευκρινίστηκε ακόμη. Κατά την άποψη όρισμένων έρευνητών (6), δρᾶ έμμεσα και οι 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 έργασίας 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 τρεις καμπύλες, βάσει μοριακού βάρους. Στην πρώτη καμπύλη άπομονώθηκαν οι 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, σχηματίζοντας 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 ήλεκτρικού φορτίου των ούσιων, ένα κλάσμα, που άποτελείται από μία μόνον ούσια και έχει ένισχυτική ιδιότητα σε συνδυασμό με έμβόλιο Α.Π.

Έπειδή ή δυνατότητα χρησιμοποίησεως του διευκολυντικού παράγοντα της σαπωνίνης, διαχωρισμένου από τον αιμολυτικό και κυρίως από τον έρεθιστικό παράγοντα, θα προσέφερε μεγάλες υπηρεσίες στον έμβολιασμό κατά του άφθώδους πυρετού, γίνεται στην παρούσα έργασία μία 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-

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.

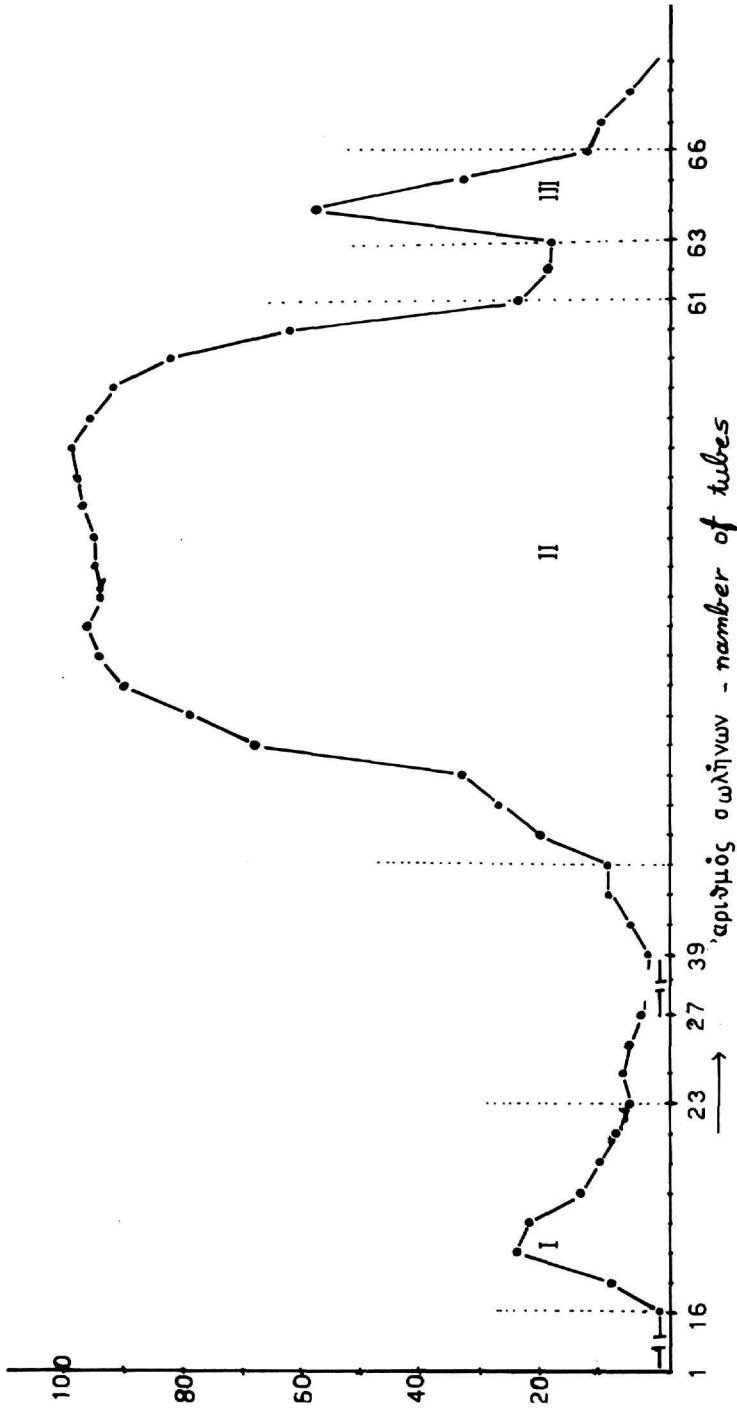
Τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 δὲν χρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200.

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 ἔλεγχον τῆς ἐπίδρασης τῆς σαπωνίνης στὴν ἀνοσία, ἐμβολιάστη-



Σχήμα Νο. 1: Διαχωρισμός σαπωνίνης με χρωματογραφία σέπη σε στήλη 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 ἐξετάστηκε 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	++++	++++	++++	----
Κλάσμα σαπ. I από G-200	++++	+++-	++++	----
Fraction I by G-200				
Κλάσμα σαπ. II από G-200	++++	+---	----	----
	++++	++	----	----
	++++	+	(+)	----
Fraction II by G-200	++++	+---	----	----

1,13

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

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

Ἐμβόλιο Ἀφθώδους Πυρετοῦ
Foot-and-mouth disease vaccine

Dilution of saponin or its fractions	χωρὶς σαπωνίνης without saponin	Μὲ σαπωνίνη ἢ κλασμάτων αὐτῆς With saponin or its fractions		Μάρτυρες ἀντιγόνου 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		
Ἀραιώσεις σαπ. ἢ κλασμ.		1:80 (0,625 mg SAP)	1:5	1:10	1:40	1:80	
Λογάριθμος ἀραιώσεων ἐμβολίου. Logar. of vaccine dilution							
0,6	---	---	---	---	---	---	+++++
1,2	+++	---	+++	+++	+++	+++	+++
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ΠΔ _{I₅₀} /Κυβ. ἔκατ. 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. Ή 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%. Ή πλάκα σκεπάστηκε με διαφανή κόλλα και επώαστηκε 48 ώρες / 37° C. Για να γίνει ή ανάγνωση τής 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. Ήκει όπου έδρασε ο ιός, δηλαδή δέν έξουδετερώθηκε ο ιός, δέν 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 τής σαπωνίνης βάσει μοριακού βάρους. Τα μεγαλομόρια εκλύονται πρώτα. Ή δυνατότητα διαχωρισμού ουσιών βάσει μοριακού βάρους στο πήκτωμα G-200 είναι πολύ πιό μεγάλη. Γι' αυτό, μετά την χρωματογραφία σε G-25, το κλάσμα Α, πού πρέπει κυρίως να έχει τις περισσότερες μεγαλομοριακές ουσίες επαναχρωματογραφήθηκε σε G-200, όπου πήραμε τρεις καμπύλες.

Τα κλάσματα τής πρώτης καμπύλης (I) έχουν μιá θολάδα και δέν άφρίζουν. Τα κλάσματα τής καμπύλης II έχουν το χαρακτηριστικό χρώμα τής σαπωνίνης (ξανθό-καφέ) και άφρίζουν. Τα κλάσματα τής τρίτης καμπύλης (III) άφρίζουν ελαφρά και δέν έχουν χρώμα. Τα ένδιάμεσα κλάσματα, πού δέν δίνουν καμπύλη, δέν παρουσιάζουν κανένα άπ' αυτά τα χαρακτηριστικά.

Οί Strobbe και συνεργ. (1974, 1975) παρατήρησαν, ότι ή διευκολυντική ιδιότητα τής σαπωνίνης βρίσκεται στις μεγαλομοριακές ουσίες. Γι' αυτό και ή δική μας έρευνα κατευθύνθηκε στην μελέτη των μεγαλομοριακών ουσιών τής σαπωνίνης, ήτοι εκείνων πού 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 άραίωση 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 ιδιότητα 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 ἰδ. Α-Ξάνθης καὶ 0-Πέπλου, ὄλοι οἱ ὀροὶ βρέθηκαν στὴν ἀραίωση 1:20 ἀρνητικοί.

Ἐπίσης στὴν ὀροεξουδετέρωση, στὴν ἀραίωση 1:16, ἦσαν ὄλοι οἱ ὀροὶ ἀρνητικοί ὡς πρὸς τὸν ἰδ. 0-Πέπλου, ἐνῶ ὡς πρὸς τὸν ἰδ. Α-Ξάνθης, δηλαδή ὡς πρὸς τὸν ἰδ. 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 ἐκείνης 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 οροεξουδετερωτικών αντίσωμάτων 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.

Έμβολιο Άφώδους Πυρετού

Λογάρithμος 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			
0,6	1,80	1:60	1:5	1:10	1:40	1:80
1,2	2,55	1,80	1,65	2,10	1,95	1,95
1,8	1,16	1,75	1,75	2,00	2,47	3,0
	3,00	2,17	2,00	1,54	1,40	2,8

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

Τó διάλυμα σαπωνίνης 40% αιμολύει αίμοσφαιρία προβάτου (3% έναιώρημα αίμοσφαιρίων πλυμένα και άραιομένα σε ρυθμιστικό διάλυμα βερονάλης) στην άραιωση με 0,075 mg τουλάχιστον σαπωνίνη. Τó κλάσμα A του G-25 αιμολύει στην άραιωση με 0,156 mg και τó 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 έρυθρών 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 έρυθρών. Γίνεται σκέψη αξιοποιήσεως της μεθόδου στην άνίχνευση μικροποσοτήτων σαπωνίνης.

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

Ο τίτλος όροεξουδετερωτικών αντισωμάτων ίνδοχοιριδίων μετά τόν έμβολιασμό και την μόλυνση με τόν 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 πρός τόν ίο 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—