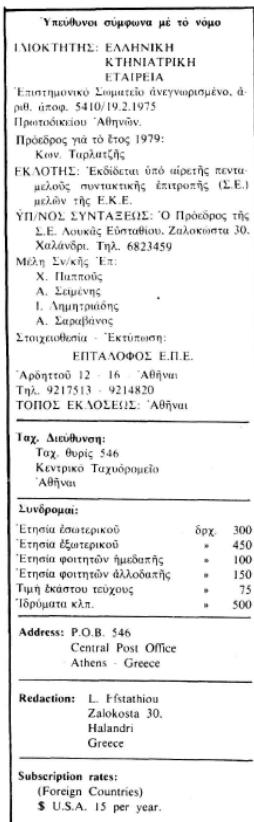


Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 30, No 1 (1979)



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

"Επιτυγχάνεται η επίβαση μετατελεόντων ζώων" όνομα
μετα κ. Άγγ. Παπαδοπούλου, Κηφ. Ινστ. Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά δόσης 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 ΕΜΒΟΛΙΟ ΑΦΘΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ

'Υπό

I. A. 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 (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. Ινστ. 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

Το σαπωνίνη ($C_{32}H_{52}O_{17}$) είναι φυτικής προελεύσεως γλυκωσίδη, που δὲν περιέχει αζωτο. Τὸ σημεῖο τήξεως είναι 195° C, είναι διαλυτή στὸ νερό, ἀδιάλυτη στὸ οἰνόπνευμα, στὸν αἴθερα καὶ στὸ χλωροφόριο (11).

Τὰ παράγωγα τῆς ὑδρολύσεως τῆς σαπωνίνης είναι ή Sapogenin καὶ ή Sucrose (10, 11, 12, 13). Τὸ σαπωνίνη αἱμολύνει τὰ ἐρυθρὰ αἱμοσφαίρια καὶ ἂν ἐνοφθαλμιστεῖ παρεντερικά, προξενεῖ ἐρεθισμὸ μέχρι καὶ νέκρωση τῶν ιστῶν. Σὲ συνδιασμῷ μὲν ἔνα ἀντιγόνο, δρᾶ ἡ σαπωνίνη ὡς διευκολυντικός παράγοντας στὴν ἀνοσοποίηση (4).

Ἐχουν γίνει πολλὲς προσπάθειες ἀξιοποίησεως τῆς σαπωνίνης ὡς διευκολυντικοῦ παράγοντα μὲ τὸ ἐμβόλιο τοῦ Ἀφθωδούς Πυρετοῦ (2, 3, 7, 8, 9, 10, 11).

Τὸ πῶς δρᾶ ἡ σαπωνίνη διευκολυντικά στὴν ἀνοσοποίηση μὲ κάποιο ἀντιγόνο, δὲν διευκρινίστηκε ἀκόμη. Κατὰ τὴν ἄποινη δρισμένων ἐρευνητῶν (6), δρᾶ ἔμεσα καὶ οἱ ίδιότητες τῆς νὰ αἱμολύνει, νὰ ἐρεθίζει καὶ νὰ διευκολύνει τὴν ἀνοσοποίηση, δὲν ἔχουν μεταξὺ των σχέσεων. Ο διευκολυντικός παράγοντας τῆς σαπωνίνης παραμένει καὶ μετὰ τὴν ἔξουδετέρωση τοῦ αἱμολύντικοῦ παράγοντα (5).

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

Οἱ Stroble καὶ συν. (1974) προσπάθησαν ἀνεπιτυχῶς νὰ ἀπομονώσουν τὶς ίδιότητες αὐτὲς τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G 100. Κατ’ αὐτοὺς ὁ ἐρεθιστικὸς καὶ ὁ διευκολυντικὸς παράγοντας τῆς σαπωνίνης, κάτω ἀπὸ τὶς συνθήκες ἐργασίας των, ἦταν πάντα μαζὶ στὸ κλάσμα, διόπου βρίσκονταν καὶ διαμολυτικός παράγοντας.

Ο Dalsgaard (3) προσπάθησε ἐπίσης νὰ διαχωρίσει τὶς ίδιότητες τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G-200, διόπου πήρε τρεῖς καμπύλες, βάσει μοριακοῦ βάρους. Στὴν πρώτη καμπύλη ἀπόμονώθηκαν οἱ μεγαλομοριακὲς οὐσίες χωρὶς αἱμολυντική ίδιότητα, ἐνῶ στὴν δεύτερη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες μὲ δλα τὰ χαρακτηριστικὰ τῆς σαπωνίνης καὶ στὴν τρίτη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες ποὺ αἱμολύνουν τὰ ἐρυθρὰ αἱμοσφαίρια, σχηματίζουν ἀφρό ἀλλὰ εἶναι χωρὶς χρῶμα. Ένας διαχωρισμὸς τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα ἀπὸ τὶς ἄλλες ίδιότητες δὲν ἐπιτεύχθηκε.

Ο ἴδιος ὁ συγγραφέας (15) κατόρθωσε ἀργότερα νὰ ἀπομονώσει ἀπὸ τὸ φυτό QUILLAJA SAPONARIA MOLLINA σὲ συνδυασμῷ χρωματογραφίας βάσει μοριακοῦ βάρους καὶ ἡλεκτρικοῦ φορτίου τῶν οὐσιῶν, ἔνα κλάσμα, ποὺ ἀποτελεῖται ἀπὸ μιὰ μόνον οὐσία καὶ ἔχει ἐνισχυτική ίδιότητα σὲ συνδυασμῷ μὲ ἐμβόλιο Α.Π.

Ἐπειδὴ ἡ δυνατότητα χρησιμοποίησεως τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα τῆς σαπωνίνης, διαχωρισμένου ἀπὸ τὸν αἱμολυτικὸ καὶ κυρίως ἀπὸ τὸν ἐρεθιστικὸ παράγοντα, θὰ προσέφερε μεγάλες ὑπηρεσίες στὸν ἐμβολιασμὸ κατὰ τοῦ ἀφθωδούς πυρετοῦ, γίνεται στὴν παρούσα ἐργασία μιὰ ἀκόμη προσπάθεια διαχωρισμοῦ τῶν ίδιοτήτων τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G-25 καὶ C-200 διόπου 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: Ό διαχωρισμὸς τῆς σαπωνίνης ἔγινε πρῶτα μὲ Sephadex G-25 Normal σὲ στήλη $2,6 \times 45$ ἑκατ. μὲ ὅγκο πηκτώματος $2,6 \times 40$ ἑκατ. Άπο τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% ἐναποθετήθηκαν 8 κυβ. ἑκατ. στὴν στήλη 9 διαδοχι-

κές φορές. Άπο τὴν στιγμὴ ἐναποθέσεως τῶν 9 κυβ. ἑκατ. διαλύματος σαπωνίνης στὴν στήλη, ἄρχισε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ύγροῦ. Ἐγινε συλλογὴ δύο κλασμάτων ἀνὰ 50 κυβ. ἑκατ. (κλάσμα A καὶ B). Τὸ σύνολο τῶν κλασμάτων A καὶ B 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 μισὸ τῆς συνολικῆς ποσότητας τοῦ ἀρχικοῦ διαλύματος 40% σαπωνίνης ποὺ χρωματογραφήθηκε.

Στὴ συνέχεια χρωματογραφήθηκε τὸ κλάσμα A τοῦ G25 σὲ Sephadex G-200 (δύκος πηκτώματος $2,6 \times 95$ ἑκατ.).

Κάθε φορὰ ἐναποθέτονταν στὴν στήλη 5 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ τὸ κλάσμα A τοῦ G-25 καὶ ἀμέσως ἄρχισε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ύγροῦ 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 ύγρὸ ποὺ ἐκλύθηκε στοὺς σωλῆνες 16-23 ἔδωσε τὴν καυμπύλη I, στοὺς σωλῆνες 42-61 τὴν καμπύλη II καὶ στοὺς σωλῆνες 63-65 τὴν καμπύλη III (σχῆμα No 1). Στὴ συνέχεια συμπυκνώθηκαν τὰ κλάσματα τῶν ἀντιστοίχων καμπύλων σὲ 5 κυβ. ἑκατ.) καὶ ἔξετάστηκαν περαιτέρω.

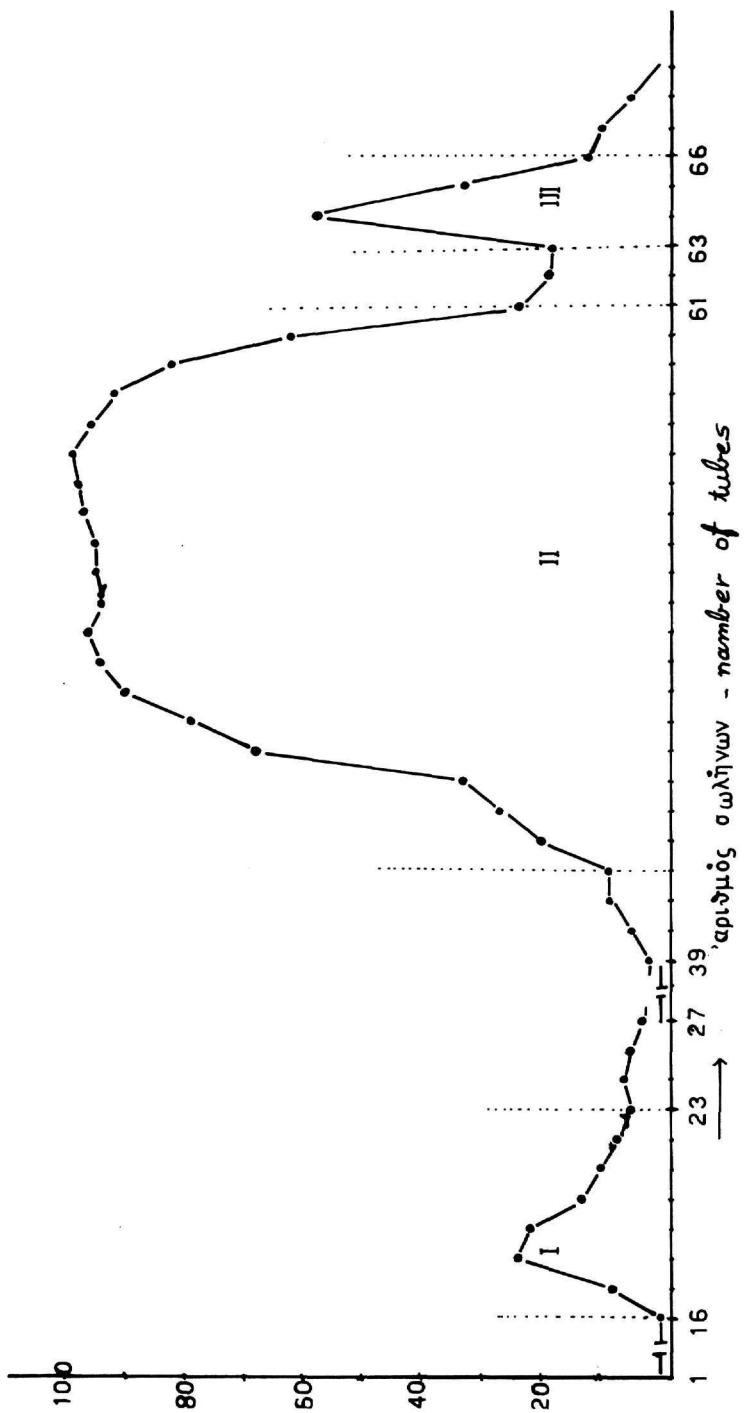
Τὸ κλάσμα B τοῦ G-25 δὲν χρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200.

Αἰμόλυση: Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μὲ ἐρυθρὰ αἷμοσφαίρια προβάτου πλυμένα καὶ ἀραιωμένα 3% μὲ ρυθμιστικὸ διάλυμα βερονάλης. Ἡ αἰμόλυση ἔγινε μέσα σὲ σωλῆνες αἵμολύσεως ὅπου σὲ 1 κυβ. ἑκατ. 3% ἐρυθρῶν προβάτου προστέθηκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραιώσῃ σαπωνίνης (ἀραιώσεις σαπωνίνης μὲ λογάριθμο τοῦ 2), καὶ ἐπωάστηκε 2 ὥρες / 37° C. Παράλληλα ἔγινε αἵμόλυση τῶν ἴδιων ἀραιώσεων σαπωνίνης μέσα σὲ αἵματοῦ ἄγαρ. Μέσα σὲ 1% ἄγαρ (τῆς Merck) σὲ θερμοκρασίᾳ 48° C προστέθηκαν ὑπὸ ἀνάδευση 3% ἐρυθρὰ προβάτου πλυμένα (4-5 φορές) μὲ βερονάλη. Τὸ αἵματοῦ ἄγαρ μεταγγίστηκε σὲ ὑλίνα τρυβλία σὲ δόριζόντια θέση καὶ σὲ πάχος περίπου 3 χιλιοστῶν. Ἀφοῦ ἔπηξε τὸ ἄγαρ, σφραγίστηκε ἀυτὸ μὲ τὴν σφραγίδα (κυλινδρικὸς κόπτης) ἐκκενώθηκε τὸ ἄγαρ ἀπὸ τὶς τρύπες καὶ σ' αὐτὲς μπῆκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραιώσῃ σαπωνίνης. Ἡ ἐπώαση ἔγινε γιὰ 2 ὥρες σὲ κλίβανο τῶν 37° C.

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

Ἐρεθισμός-νέκρωση: Τὰ κλάσματα τῆς σαπωνίνης ἀραιώθηκαν μὲ φυσιολογικὸ ὄρο 1:10 ἔως 1:320 καὶ ἀπὸ κάθε ἀραιώσῃ ἐνοφθαλμίστηκε σὲ δύο σημεῖα τῆς πλάτης δύο ἵνδοχοιρίδιων ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. Ἡ τελικὴ ἀνάγνωση τοῦ ἐρεθισμοῦ καὶ τῆς τοπικῆς νέκρωσης ἔγινε 5 μέρες μετὰ τὸν ἐνοφθαλμισμὸ (πίνακας 2).

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



ΠΙΝΑΚΑΣ 1

TABLE 1

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

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

Άραιώσεις σαπωνίνης ή κλασμάτων αυτής	Dilution of sapon 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. έκατ. 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 Α άπό G-25		+	+	+	+	+	+	+	-	-
Fraction A by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης Β άπό G-25		+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fraction B by G-25										
Κλάσμα σαπωνίνης I άπό G-200		+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fraction I by G-200										
Κλάσμα σαπωνίνης II άπό G-200		+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fraction II by G-200										

+ = πλήρης αιμόλυση, - = καμία αιμόλυση

+ = Total hemolysis, - = none hemolysis

καμία αιμόλυση σε 10-πλάσιο δύκο

None Hemolysis in 10-fold volume

καν ίνδοχοιρίδια μὲ ξα διδύναμο έμβολιο Αφθώδους Πυρετοῦ (Α-Ξάνθης και 0-Πέπλου σειρᾶς 282 μὲ Π.Δ.Ι. 0,0625 κυβ. έκατ. έμβολίου ώς πρὸς Α-Ξάνθης) χωρὶς προσθήκη σαπωνίνης και μὲ προσθήκη σαπωνίνης ή κλασμάτων αυτής (πίνακας 3). Σὲ κάθε ίνδοχοιρίδιο ένοφθαλμίστηκε 1 κυβ. έκατ. έμβολίου μὲ 0,05 κυβ. έκατ. σαπωνίνης ή κλάσματος αυτής. Τέσσερεις έβδομαδες μετὰ τὸν έμβολιασμὸ μολύνθηκαν τὰ ίνδοχοιρίδια αὐτὰ ίνδοδερμικῶς στὸ ξα πέλμα μὲ ίὸ Αφθ. Πυρετοῦ τύπου, Α-Ξάνθης, προσαρμοσμένο σε ίνδοχοιρίδιο. Ή τελικὴ ἀνάγνωση ἔγινε 7 ήμέρες μετὰ τὴν μόλυνση βάσει τῶν ἀνατομοπαθολογικῶν ἀλλοιώσεων στὰ πόδια (πέλμα) και στὴ γλώσσα.

Άνιχνευση ἀντισωμάτων: Μετὰ τὴν τελικὴ ἀνάγνωση τῶν ἀποτελεσμάτων, ήτοι 35 μέρες μετὰ τὸν έμβολιασμό, τὰ ίνδοχοιρίδια ἀφαιμάχθηκαν και διόρος των ἐξετάσθηκε ώς πρὸς εἰδικὰ ἀντισώματα κατὰ τῶν τύπων Α-Ξάνθης

ΠΙΝΑΚΑΣ 2
TABLE 2

Τοπική νέκρωση ιστών ιγδοχοφρίδων άπό σαπωνίνη ή κλασμάτων αύτης*
Local necrosis of guinea pigs tissues by saponin or its fractions*

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

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

* Επεξήγηση: +++ νέκρωση δέρματος και υποδροίου ίστοι σε διάμετρο μεγαλύτερη από 1,5 εκατ.

* Legend: Skin and hypodermic tissue necrosis with a diameter bigger than 1,5 cm.
 +++ Διάμετρος μικρότερη από 1,5 εκατ.

Diameter less than 1,5 cm.

++-- διάμετρος νέκρωσης 0,5-1 εκατ.

diameter 0,5-1 cm

+--- διάμετρος νέκρωσης 0,2-0,5 εκατ.

diameter 0,2-0,5 cm

---- καμία λύση δέρματος
Intact skin.

σε δεκαπλάσιο όγκο (0,5 κυβ. εκατ.) καμία νέκρωση
none necrosis in 10 fold volume

ΠΙΝΑΚΑΣ 3
TABLE 3

*Επίδραση της σαπωνίνης και των κλασμάτων αυτής στην άνοσοποίηση του εμβολίου Α.Π.-στά ινδοχοιρίδια.
Influence of saponin and its fractions on the immunization of FMD-Vaccine in guinea pigs.

Χωρίς σαπωνίνη without saponin		Με σαπωνίνη ή κλασμάτων αυτής With saponin or its fractions		Μάρτυρες dantigónou	
Dilution of saponin or its fractions	Διάλυμα στατ. 40% Dilution of saponin 40%	Dilution of saponin 40% Fract. I G-200	Kλάσμα I G-200 Fract. II G-200	Kλάσμα II G-200 Fract. II G-200	Antigen Kontrols
·Αριθμός σαπ. ή κλασμ.	1:80 (0,625 mg SAP)	1:160 (0,312 mg SAP)	1:5	1:10	1:40
Λογάριθμος πάρατο- σεων έμβολων. Logar. of vaccine dilution	— +++ +++	— ++ ++	— +++ +++	— +++ +++	— +++ +++
ΠΔ.Ι. ₅₀ /Κυβ. PDGP ₅₀ /ml	0,125	0,031	0,062	0,125	0,160
					0,160

(A₂₂)καὶ Ο-Πέπλου, στὴν ἐκτροπὴ τοῦ συμπληρώματος (ΕΣ) καὶ στὴν ὀροεξουδετέρωση, ἀφοῦ πρηγουμένως ἀδρανοποιήθηκαν οἱ ὄροι 30° /56° C.

Γιὰ τὴν Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν οἱ ὄροι μόνον στὴν ἀραιώσῃ 1:20. Ἡ ὀροεξουδετέρωση ἔγινε μὲ τὴν μικρομέθοδο (14). Οἱ ὄροι ἀραιώθηκαν μὲ λογάριθμο τοῦ 4 ἀπὸ 1:16 ἕως 1:1024. Ἀπὸ κάθε ἀραιώσῃ ὄροῦ τοποθετήθηκε σὲ δύο βυθίσματα ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. σ' αὐτὸ προστέθηκε ἵσος δγκος ἀντιγόνου (ἰδὸς A₂₂ καὶ Ο-Πέπλου ἀντίστοιχα) 50-100 DCID₅₀ ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. Μετὰ ἀπὸ 1 ὥρα σὲ θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκε σὲ κάθε βυθίσμα 0,05 κυβ. ἑκατ. κύτταρα IBRS (ἀριθμὸς κυττάρων $1,3 \times 10^6$ /1 κυβ. ἑκατ.) μέσα σὲ ὀλικὸ Eagle μὲ τελικὸ ποσοστὸ ὄροῦ μόσχου 3,3%. Ἡ πλάκα σκεπάστηκε μὲ διαφανὴ κόλλα καὶ ἐπωάστηκε 48 ὥρες / 37° C. Γιὰ νὰ γίνει ἡ ἀνάγνωση τῆς ὀροεξουδετέρωσης, ξεσκεπάστηκαν οἱ πλάκες ἀδειάστηκε τὸ περιεχόμενο καὶ προστέθηκε στὰ βυθίσματα ειδικὴ χρωστικὴ (Kristalviolett 0,1% μὲ 10% φορμόλη 37%). Μετὰ ἀπὸ 10 λεπτά, ξεπλύθηκαν οἱ πλάκες καὶ ἔγινε ἡ ἀνάγνωση. Ἐκεῖ δου ἔδρασε ὁ ἴος, δηλαδὴ δὲν ἔξουδετερώθηκε ὁ ἴος, δὲν σχηματίστηκε ταπήτιο κυττάρων (14).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μὲ τὴν χρωματογραφία τοῦ διαλύματος σαπωνίνης 40% πρῶτα σὲ πήκτωμα Sephadex G-25, ἔγινε προσπάθεια χοντρικοῦ διαχωρισμοῦ τῶν οὖσιῶν τῆς σαπωνίνης βάσει μοριακοῦ βάρους. Τὰ μεγαλομόρια ἐκλύονται πρῶτα. Ἡ δυνατότητα διαχωρισμοῦ οὖσιῶν βάσει μοριακοῦ βάρους στὸ πήκτωμα G-200 εἶναι πολὺ πιὸ μεγάλη. Γι' αὐτό, μετὰ τὴν χρωματογραφία σὲ G-25, τὸ κλάσμα A, ποὺ πρέπει κυρίως νὰ ἔχει τὶς περισσότερες μεγαλομοριακὲς οὐσίες ἐπαναχρωματογραφήθηκε σὲ G-200, δου πήραμε τρεῖς καμπύλες.

Τὰ κλάσματα τῆς πρώτης καμπύλης (I) ἔχουν μιὰ θολάδα καὶ δὲν ἀφρίζουν. Τὰ κλάσματα τῆς καμπύλης II ἔχουν τὸ χαρακτηριστικὸ χρῶμα τῆς σαπωνίνης (ξανθό-καφέ) καὶ ἀφρίζουν. Τὰ κλάσματα τῆς τρίτης καμπύλης (III) ἀφρίζουν ἐλαφρὰ καὶ δὲν ἔχουν χρῶμα. Τὰ ἐνδιάμεσα κλάσματα, ποὺ δὲν δίνουν καμπύλη, δὲν παρουσιάζουν κανένα ἀπ' αὐτὰ τὰ χαρακτηριστικά.

Οἱ Strobbe καὶ συνεργ. (1974, 1975) παρατήρησαν, δτι ἡ διευκολυντικὴ ιδιότητα τῆς σαπωνίνης βρίσκεται στὶς μεγαλομοριακὲς οὐσίες. Γι' αὐτὸ καὶ ἡ δική μας ἔρευνα κατευθύνθηκε στὴν μελέτη τῶν μεγαλομοριακῶν οὖσιῶν τῆς σαπωνίνης, ἦτοι ἐκείνων ποὺ πήραμε στὴν καμπύλη I καὶ II ἀπὸ τὸ κλάσμα A τοῦ G-25.

Βασικά, ἡ ἔξέταση τῶν κλασμάτων αὐτῶν (I καὶ II) ως πρὸς τὴν αἴμολυση, τὸν ἐρεθισμὸ καὶ τὴν νέκρωση, ἔγινε σὲ σύγκριση μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% καὶ μὲ τὰ κλάσματα A καὶ B τοῦ G-25 (βλέπε πίνακα 1 καὶ 2) ἐνῶ ως πρὸς τὴν ἐπίδραση αὐτῶν στὴν ἀνοσοποίηση συγκρίθηκαν μόνον μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% σὲ δρισμένη ποσότητα μέσα στὸ ἐμβόλιο (πίνακας 3).

“Οπως φαίνεται στὸν πίνακα 1, ἡ σαπωνίνη 40% αἴμολύει καὶ στὴν ἀραιώση 1:640 ἦτοι σὲ ποσότητα οὐσίας σαπωνίνης 0,078 χιλιοστόγραμμα (mg).

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

Μεταξύ τῶν κλασμάτων I καὶ II τοῦ πηκτώματος G-200, τὸ πρῶτο δὲν αίμολύει οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὅγκο, ἐνῶ τὸ δεύτερο (II) δίνει σχεδόν τὴν ἴδια αίμόλυνση μὲ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25. Δηλαδή, ἡ αίμολυντικὴ ἴδιότητα βρίσκεται καὶ στὰ δύο κλάσματα τοῦ G-25, στὸ G-200 δῆμως ἀπομονώνεται στὰ κλάσματα τῆς καμπύλης II, ἐνῶ οἱ μεγαλομοριακὲς οὐσίες ποὺ βρίσκονται στὴν καμπύλη I δὲν αίμολύουν καθόλου.

Ἡ αίμόλυνση τῆς σαπωνίνης καὶ τῶν κλασμάτων αὐτῆς, πού ἔγιναν συγκριτικὰ σὲ ἐναιώρημα ἐρυθρῶν (3%) καὶ σὲ αίματοῦχο ἄγαρ (1 ἄγαρ μὲ 3% ἐρυθρὰ προβάτου), ἀπέδειξε, διτὶ ὁ τίτλος τῆς αίμόλυνσης στὸ ἄγαρ εἶναι περίπου 3 ἀραιώσεις (μὲ λογάριθμο τοῦ 2) πιὸ ψηλά. Ἡ μέθοδος αὐτὴ ἐνδείκνυται ἵσως γιὰ ἀνίχνευση μικροποστήτων σαπωνίνης. Τὸ κλάσμα I τοῦ G-200 σὲ 10-πλάσιο ὅγκο, δὲν αίμολύσει οὔτε στὸ αίματοῦχο ἄγαρ.

Ὦς πρὸς τὴν ἐρεθιστικότητα καὶ τὴν νέκρωση τοῦ δέρματος καὶ τῶν ὑποδορίων ἰστῶν σὲ ἴνδοχοιρίδια, δπως φαίνεται στὸν πίνακα No 2, ἡ ποσότητα σαπωνίνης σὲ χιλιοστόγραμμα κατὰ δόση σαπωνίνης στὸ ἐμβόλιο (0,05 κυβ. ἑκατ. ἀνὰ σημεῖο ἐνοφθαλμισμοῦ) 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% ἥτοι 3,4 mg καὶ ἀκολουθεῖ τὸ κλάσμα II τοῦ G-200 μὲ 3 mg, τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 μὲ 1,13 mg. Τὸ πρῶτο κλάσμα τοῦ G-200 (Κλάσμα I) ποὺ ἔχει τὰ μεγαλομοριακὰ στοιχεῖα τῆς σαπωνίνης, δὲν προξενεῖ ἐρεθισμὸ καὶ νέκρωση οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὅγκο.

Κατὰ τὴν ἀνίχνευση ἀντισωμάτων ἐκτροπῆς τοῦ συμπληρώματος ὡς πρὸς τὸν Ἰδ A-Ξάνθης καὶ 0-Πέπλου, δλοι οἱ ὄροι βρέθηκαν στὴν ἀραίωση 1:20 ἀρνητικοί.

Ἐπίσης στὴν ὀροεξουδετέρωση, στὴν ἀραίωση 1:16, ἥσαν δλοι οἱ ὄροι ἀρνητικοὶ ὡς πρὸς τὸν Ἰδ 0-Πέπλου, ἐνῶ ὡς πρὸς τὸν Ἰδ A-Ξάνθης, δηλαδὴ ὡς πρὸς τὸν Ἰδ ποὺ χρησιμοποιήθηκε γιὰ τὸν ἐμβολιασμὸ 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%, δπου προστατεύονται καὶ τὰ τέσσερα ἴνδοχοιρίδια, δίνει κατὰ μέσο δρο χαμηλότερο τίτλο ἀντισωμάτων ἀπὸ τὸ ἐμβόλιο στὴν ἀραίωση 1:64 καὶ μὲ τὴν ἴδια ποσότητα σαπωνίνης δπου γενίκευσαν δλα τὰ ζῶα.

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

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

ΠΙΝΑΚΑΣ 4
TABLE 4

Τίτλος δροεξουδετερωτικού άντιστομάτων ώς πρός τὸν ιὸ Α.Π. τύπο A₂₂ μετά από έμβολασμό (μὲ καὶ χωρὶς σαπονίνη) καὶ μόλυνση.
Title of neutralizing antibodies to FMDV type A₂₂ in guinea pigs after vaccination (with or without saponin) and challenge.

***Εμβόλο Αφθόνους Πυρετού**

Λογαρίθμος άρασθεού έμβολου	Χωρίς στοπωνίνη without saponin	Με προσθήκη στοπωνίνης ή κλασμάτων της With saponin or its fractions	Διάλυμα στατ. 40%					Μέγιστρος Κοντρού	
			Dilution of sap. 40%	Kλασ. I G-200 Fract. I by G-200	Kλασ. II G-200 Fract. II by G-200	Kλασ. III G-200	Kλασ. IV G-200		
0,6	2,10*	2,55	1:80	1:60	1:5	1:10	1:40	1:80	
1,2	1,64	1,16							
1,8	1,60	3,00							

* Λογάριθμος τίτλου δροεξουδετερωτικῶν άντιστομάτων ίνδοχορίδιων. Ο δροθυμός έκφραζε τὸ μέσο δρο τίτλου 4 ίνδοχορίδιων.

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

Όπως φαίνεται (πίνακας 3), τὸ ἐμβόλιο χωρίς προσθήκη σαπωνίνης έχει τίτλο Π.Δ.Ι.₅₀ 0,9 (0,125 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου).

Μὲ προσθήκη 0,312mg σαπωνίνης ἀπὸ τὰ διαλύματα 40% έχει τίτλο Π.Δ.Ι.₅₀ 1,2 (0,062 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου) καὶ 1,5 (0,031 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου) ἀντιστοίχως. Τὰ κλάσματα I καὶ II τοῦ G-200, δὲν ἔνισχύουν τὴν ἀνοσοποιὸ δύναμη τοῦ ἐμβολίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ἐγινε προσπάθεια διαχωρισμοῦ τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα τῆς σαπωνίνης ἀπὸ τὸν αἵμολυτικὸ καὶ ἐρεθιστικὸ παράγοντα μὲ τὴν μέθοδο τῆς χρωματογραφίας.

Σαπωνίνη διαλύματος 40% χρωματογραφήθηκε πρῶτα σὲ Sephadex G-25 καὶ τὸ πρῶτο κλάσμα ἀπὸ τὸ διάλυμα αὐτὸ ἐπαναχρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200. Ἀπὸ τὶς τρεῖς καμπύλες ποὺ πήραμε ἀπὸ τὸ Sephadex G-200, ἔξετάσαμε μόνον τὶς δύο πρᾶτες. Συγκρίθηκαν αὐτές μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% στὴν αἵμολυση, νέκρωση καὶ στὴν ἔνισχυτική των ἰδιότητα στὸ ἐμβόλιο ἀφθώδους πυρετοῦ (τύπος A₂₂).

Τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% αἵμολύει αἵμοσφαιρία προβάτου (3% ἐναιώρημα αἵμοσφαιρίων πλυμένα καὶ ἀραιωμένα σὲ ρυθμιστικὸ διάλυμα βερονάλης) στὴν ἀραιώση μὲ 0,075 mg τουλάχιστον σαπωνίνη. Τὸ κλάσμα A τοῦ G-25 αἵμολύει στὴν ἀραιώση μὲ 0,156 mg καὶ τὸ κλάσμα B τοῦ G-25 στὴν ἀραιώση μὲ 0,312 mg σαπωνίνης. Τὰ κλάσματα τῆς καμπύλης II τοῦ G-200 αἵμολύουν μὲ 0,156 mg ἐνῶ τῆς καμπύλης I δὲν αἵμολύουν οὔτε μὲ 10-πλάσια ποσότητα.

Ἡ αἵμολυση δοκιμάσθηκε συγκριτικὰ σὲ 3% ἐναιώρημα ἐρυθρῶν αἵμοσφαιρίων προβάτου καὶ σὲ αἵματοῦ ἄγαρ (1% ἄγαρ μὲ 3% αἵμοσφαιρία προβάτου). Ὁ αἵμολυτικὸς τίτλος τῆς σαπωνίνης στὸ αἵματοῦ ἄγαρ εἶναι 3 ἀραιώσεις ψηλότερα (μὲ λογάριθμο τοῦ 2) ἀπὸ ἐκεῖνον σὲ ἐναιώρημα ἐρυθρῶν. Γίνεται σκέψη ἀξιοποιησεως τῆς μεθόδου στὴν ἀνίχνευση μικροποστήτων σαπωνίνης.

Ο βαθμὸς τοῦ ἐρεθισμοῦ καὶ τῆς νέκρωσης διαφέρει μεταξὺ τῆς αὐτούσιας σαπωνίνης καὶ τῶν κλασμάτων αὐτῆς. Τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% προξενεῖ 50% νέκρωση μὲ 0,8 mg, τὸ κλάσμα A τοῦ G-25 μὲ 3,4 mg τὸ B τοῦ G-25 μὲ 1,13 καὶ τὸ κλάσμα II τοῦ G-200 μὲ 3mg ἐνῶ τὸ κλάσμα I τοῦ G-200 δὲν προκαλεῖ νέκρωση οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὅγκο.

Ο τίτλος ὁροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ἴνδοχοιριδίων μετὰ τὸν ἐμβολιασμὸ καὶ τὴν μόλυνση μὲ τὸν ἴδιο τύπο ίοῦ Ἀφθώδης Πυρετοῦ (τύπος A₂₂), παρουσιάζει διακυμάνσεις καὶ δὲν έχει σχέση μὲ τὴν παρεχομένη προστασία.

Ἡ Π.Δ.Ι.₅₀ τοῦ ἐμβολίου ὡς πρὸς τὸν ἴδιο τοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ τύπου A₂₂, χωρίς προσθήκη σαπωνίνης εἶναι 0,125 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου, μὲ προσθήκη σαπωνίνης διαλύματος 40% (μὲ 0,312 mg σαπωνίνης κατὰ δόση ἐμβολίου) εἶναι 0,062 καὶ σὲ χαμηλότερη ἀραιώση (μὲ 0,625mg σαπωνίνης κατὰ δόση ἐμβολίου) εἶναι 0,062 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου.

Ή προσθήκη τῶν κλασμάτων I και II τοῦ Shephadex G-200 δὲν έπηρεάζει 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—