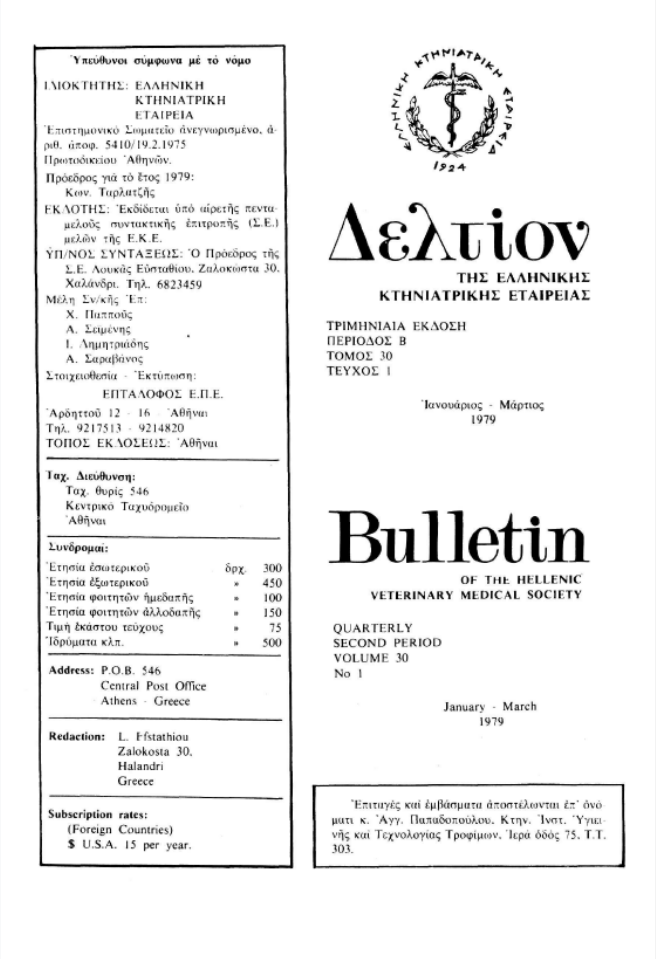
ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 30, No 1 (1979)



Υπεύθυνοι σύμφωνα με τό νόμο

ΙΔΙΟΚΤΗΤΗΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Ἐπιστημονικό Σωματεῖο ἀνεγνωρισμένο, ἀριθ. ἀποφ. 5410/19.2.1975 Πρωτοδικείου Ἀθηνῶν.
Πρόεδρος γιά τό ἔτος 1979: Κων. Ταρλατζῆς
ΕΚΔΟΤΗΣ: Ἐκδίδεται ὑπό αἱρετῆς πενταμελοῦς συντακτικῆς ἐπιτροπῆς (Σ.Ε.) μελῶν τῆς Ε.Κ.Ε.
ΥΠ/ΝΟΣ ΣΥΝΤΑΞΕΩΣ: Ὁ Πρόεδρος τῆς Σ.Ε. Λουκᾶς Εὐσταθίου, Ζαλοκώστα 30, Χαλάνδρι. Τηλ. 6823459
Μέλη Συν/κῆς Ἐπ:
Χ. Παπποῦς
Α. Σαμένης
Ι. Δημητριάδης
Α. Σαραβάνος
Στοιχειοθεσία - Ἐκτύπωση:
ΕΠΤΑΛΟΦΟΣ Ε.Π.Ε.
Ἀρδηττοῦ 12 - 16 Ἀθῆναι
Τηλ. 9217513 - 9214820
ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ: Ἀθῆναι

Ταχ. Διεύθυνση:
Ταχ. θυρίς 546
Κεντρικό Ταχυδρομεῖο
Ἀθῆναι

Συνδρομαί:

Ἐτησία ἐσωτερικοῦ	δρχ.	300
Ἐτησία ἐξωτερικοῦ	»	450
Ἐτησία φοιτητῶν ἡμεδαπῆς	»	100
Ἐτησία φοιτητῶν ἀλλοδαπῆς	»	150
Τιμή ἑκάστου τεύχους	»	75
Ἰδρύματα 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.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ 1924

Δελτίον
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΠΕΡΙΟΔΟΣ Β
ΤΟΜΟΣ 30
ΤΕΥΧΟΣ 1

Ἰανουάριος - Μάρτιος
1979

Bulletin
OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY

QUARTERLY
SECOND PERIOD
VOLUME 30
No 1

January - March
1979

Ἐπιταγές καί ἐμβάσματα ἀποστέλλονται ἐπ' ὀνόματι κ. Ἀγγ. Παπαδοπούλου, Κτην. Ἰνστ. Ὑγιεινῆς καί Τεχνολογίας Τροφίμων, Ἱερά ὁδός 75, Τ.Τ. 303.

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

Ι. Α. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

doi: 10.12681/jhvms.21384

Copyright © 2019, Ι. Α. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 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

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 19/12/2025 09:53:42

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ, 1979, Τ. 30. τ. 2

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΑΠΩΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟ ΕΜΒΟΛΙΟ ΑΦΘΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ

Ὑπὸ

Ι. Α. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗ*

Μὲ τεχνικὴ 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% sapnonin 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 smalle 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}) witout 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. Ἰνστ. Ἀφθώδους Πυρετοῦ. Ἁγία Παρασκευὴ Ἀττικῆς

0,031ml of vaccine.

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

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἡ σαπωνίνη ($C_{32}H_{52}O_{17}$) εἶναι φυτικῆς προελεύσεως γλυκωσίδη, ποὺ δὲν περιέχει ἄζωτο. Τὸ σημεῖο τήξεως εἶναι 195° C, εἶναι διαλυτὴ στὸ νερό, ἀδιάλυτη στὸ οἰνόπνευμα, στὸν αἰθέρα καὶ στὸ χλωροφόρμιο (11).

Τὰ παράγωγα τῆς ὑδρολύσεως τῆς σαπωνίνης εἶναι ἡ Sapogenin καὶ ἡ Sucrose (10, 11, 12, 13). Ἡ σαπωνίνη αἱμολύει τὰ ἐρυθρὰ αἱμοσφαίρια καὶ ἂν ἐνοφθαλμιστεῖ παρεντερικά, προξενεῖ ἐρεθισμὸ μέχρι καὶ νέκρωση τῶν ἱστῶν. Σὲ συνδιασμὸ μὲ ἕνα ἀντιγόνο, δρᾶ ἡ σαπωνίνη ὡς διευκολυντικὸς παράγοντας στὴν ἀνοσοποίηση (4).

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

Τὸ πῶς δρᾶ ἡ σαπωνίνη διευκολυντικὰ στὴν ἀνοσοποίηση μὲ κάποιο ἀντιγόνο, δὲν διευκρινίστηκε ἀκόμη. Κατὰ τὴν ἄποψη ὁρισμένων ἐρευνητῶν (6), δρᾶ ἔμμεσα καὶ οἱ ἰδιότητές της νὰ αἱμολύει, νὰ ἐρεθίζει καὶ νὰ διευκολύνει τὴν ἀνοσοποίηση, δὲν ἔχουν μεταξύ των σχέση. Ὁ διευκολυντικὸς παράγοντας τῆς σαπωνίνης παραμένει καὶ μετὰ τὴν ἐξουδετέρωση τοῦ αἱμολυτικοῦ παράγοντα (5).

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

Οἱ Strobbe καὶ συν. (1974) προσπάθησαν ἀνεπιτυχῶς νὰ ἀπομονώσουν τὶς ἰδιότητες αὐτὲς τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G 100. Κατ' αὐτοὺς ὁ ἐρεθιστικὸς καὶ ὁ διευκολυντικὸς παράγοντας τῆς σαπωνίνης, κάτω ἀπὸ τὶς συνθῆκες ἐργασίας των, ἦταν πάντα μαζὶ στὸ κλάσμα, ὅπου βρίσκονταν καὶ ὁ αἱμολυτικὸς 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 ἀπόμονώθηκαν οἱ μεγαλομοριακὲς οὐσίες χωρὶς αἱμολυτικὴ ἰδιότητα, ἐνῶ στὴν δεύτερη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες μὲ ὅλα τὰ χαρακτηριστικὰ τῆς σαπωνίνης καὶ στὴν τρίτη καμπύλη ἐκλύθησαν οὐσίες ποὺ αἱμολύουν τὰ ἐρυθρὰ αἱμοσφαίρια, σχηματίζουν ἀφρὸ ἀλλὰ εἶναι χωρὶς χρῶμα. Ἕνας διαχωρισμὸς τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα ἀπὸ τὶς ἄλλες ἰδιότητες δὲν ἐπιτεύχθηκε.

Ὁ ἴδιος ὁ συγγραφέας (15) κατόρθωσε ἀργότερα νὰ ἀπομονώσει ἀπὸ τὸ φυτὸ QUILLAJA SAPONARIA MOLLINA σὲ συνδυασμὸ χρωματογραφίας βάσει μοριακοῦ βάρους καὶ ἠλεκτρικοῦ φορτίου τῶν οὐσιῶν, ἕνα κλάσμα, ποὺ ἀποτελεῖται ἀπὸ μιὰ μόνον οὐσία καὶ ἔχει ἐνισχυτικὴ ἰδιότητα σὲ συνδυασμὸ μὲ ἐμβόλιο Α.Π.

Ἐπειδὴ ἡ δυνατότητα χρησιμοποιήσεως τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα τῆς σαπωνίνης, διαχωρισμένου ἀπὸ τὸν αἱμολυτικὸ καὶ κυρίως ἀπὸ τὸν ἐρεθιστικὸ παράγοντα, θὰ προσέφερε μεγάλες ὑπηρεσίες στὸν ἐμβολιασμὸ κατὰ τοῦ ἀφθώδους πυρετοῦ, γίνεται στὴν παρούσα ἐργασία μιὰ ἀκόμη προσπάθεια διαχωρισμοῦ τῶν ἰδιοτήτων τῆς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα Sephadex G-25 καὶ 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 2,6×45 ἑκατ. μὲ ὄγκο πηκτώματος 2,6×40 ἑκατ. Ἀπὸ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% ἐναποθετήθηκαν 8 κυβ. ἑκατ. στὴν στήλη 9 διαδοχι-

κὲς φορές. Ἀπὸ τὴν στιγμὴ ἐναποθέσεως τῶν 9 κυβ. ἑκατ. διαλύματος σαπωνίνης στὴν στήλη, ἄρχισε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ὑγροῦ. Ἔγινε 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 ΚΙΛΠΑΝ 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 Α τοῦ G25 σὲ Sephadex G-200 (ὄγκος πηκτώματος 2,6×95 ἑκατ.).

Κάθε φορὰ ἐναποθέτονταν στὴν στήλη 5 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25 καὶ ἀμέσως ἄρχιζε ἡ συλλογὴ τοῦ ἐκλυομένου ὑγροῦ 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 ὑγρὸ ποὺ ἐκλύθηκε στοὺς σωλῆνες 16-23 ἔδωσε τὴν καυμπύλη 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 ἀντιστοίχων καμπύλων σὲ 5 κυβ. ἑκατ.) καὶ ἐξετάστηκαν περαιτέρω.

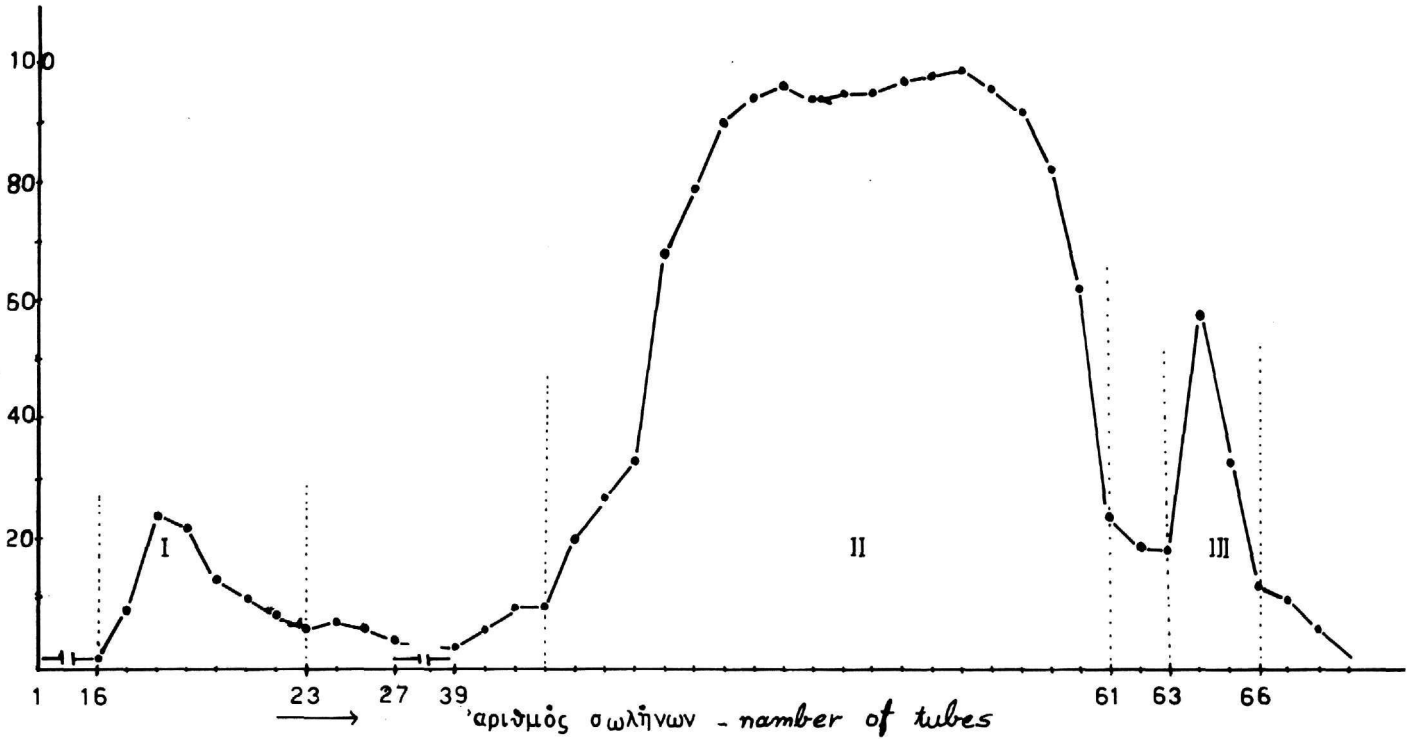
Τὸ κλάσμα Β τοῦ G-25 δὲν χρωματογραφήθηκε σὲ Sephadex G-200.

Αἱμόλυση: Ἡ αἱμόλυση ἔγινε μὲ ἐρυθρὰ αἱμοσφαίρια προβάτου πλυμένα καὶ ἀραιωμένα 3% μὲ ρυθμιστικὸ διάλυμα βερονάλης. Ἡ αἱμόλυση ἔγινε μέσα σὲ σωλῆνες αἱμολύσεως ὅπου σὲ 1 κυβ. ἑκατ.3% ἐρυθρῶν προβάτου προστέθηκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραίωση σαπωνίνης (ἀραιώσεις σαπωνίνης μὲ λογάριθμο τοῦ 2), καὶ ἐπωάστηκε 2 ὧρες /37° C. Παράλληλα ἔγινε αἱμόλυση τῶν ἰδίων ἀραιώσεων σαπωνίνης μέσα σὲ αἱματοῦχο ἄγαρ. Μέσα σὲ 1% ἄγαρ (τῆς Merck) σὲ θερμοκρασία 48° C προστέθηκαν ὑπὸ ἀνάδευση 3% ἐρυθρὰ προβάτου πλυμένα (4-5 φορὲς) μὲ βερονάλη. Τὸ αἱματοῦχο αὐτὸ ἄγαρ μεταγγίστηκε σὲ ὑάλινα τρυβλία σὲ ὁριζόντια θέση καὶ σὲ πάχος περίπου 3 χιλιοστῶν. Ἀφοῦ ἔπηξε τὸ ἄγαρ, σφραγίστηκε αὐτὸ μὲ τὴν σφραγίδα (κυλινδρικὸς κόπτης) ἐκκενώθηκε τὸ ἄγαρ ἀπὸ τὶς τρύπες καὶ σ' αὐτὲς μπῆκε 0,05 κυβ. ἑκατ. ἀπὸ κάθε ἀραίωση σαπωνίνης. Ἡ ἐπώαση ἔγινε γιὰ 2 ὧρες σὲ κλίβανο τῶν 37° C.

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

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

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



Σχῆμα No. 1.: Διαχωρισμὸς σαπωνίνης μὲ χρωματογραφία σὲ πήκτωμα SEPHADEX G-200.
Fractionation of saponin by chromatography on SEPHADEX G-200.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

TABLE 1

Αἱμόλυση σαπωνίνης καὶ κλασμάτων αὐτῆς ἀπὸ χρωματογραφία σὲ Sephadex G-200

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

Ἀραιώσεις σαπωνίνης ἢ κλασμάτων αὐτῆς	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. ἑκατ. 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 ἀπὸ G-25 Fraction A by G-25		+	+	+	+	+	+	+	–	–
Κλάσμα σαπωνίνης Β ἀπὸ G-25 Fraction B by G-25		+	+	+	+	+	+	–	–	–
Κλάσμα σαπωνίνης Ι ἀπὸ G-200 Fraction I by G-200										
Κλάσμα σαπωνίνης ΙΙ ἀπὸ G-200 Fraction II by G-200		+	+	+	+	+	+	+	–	–

+ = πλήρης αἱμόλυση, – = καμία αἱμόλυση
+ = Total hemolysis, – = none hemolysis

καμία αἱμόλυση σὲ 10-πλάσιο ὄγκο

None Hemolysis in 10-fold volume

καν ἰνδοχοιρίδια μὲ ἕνα διδύναμο ἐμβόλιο Ἀφθώδους 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. Τέσσερεις ἑβδομάδες μετὰ τὸν ἐμβολιασμὸ μολύνθηκαν τὰ ἰνδοχοιρίδια αὐτὰ ἐνδοδερμικῶς στό ἕνα πέλμα μὲ ἰὸ Ἀφθ. 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, ἤτοι 35 μέρες μετὰ τὸν ἐμβολιασμό, τὰ ἰνδοχοιρίδια ἀφαιμάχθηκαν καὶ ὁ ὀρὸς των ἐξετάσθηκε ὡς πρὸς εἰδικὰ ἀντισώματα κατὰ τῶν τύπων Α-Ξάνθης

ΠΙΝΑΚΑΣ 2
TABLE 2

Τοπικὴ νέκρωση ἱστῶν ἰνδοχοιριδίων ἀπὸ σαπωνίνη ἢ κλασμάτων αὐτῆς*
Local necrosis of guinea pigs tissues by saponin or its fractions*

Hemolytic units Αἱμολυτικὲς μονάδες	64	32	16	8	4	2	mg Σαπωνίνης
Ἀραιώσεις σαπωνίνης ἢ κλασμάτων Dilut. of sap. or its fract.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	κατὰ δόση μὲ 50% νέκρωση mg sap/dosis/50% necrosis
Σαπωνίνη 40%			++++	++++	(+)–––	(+)–––	
			++++	+–––	(+)–––	–––	
			++++	+–––	+–––	–––––	
sap. 40%			––+–	––––	––––	––––	0,80
Κλάσμα σαπ. Α ἀπὸ G-25	++++	+–––	++––	––––			
	++++	+–––	––––	––––			
	++++	+–––	––––	––––			
	++++	––––	––––	––––			
Fraction A by G-25							3,4
Κλάσμα σαπ. Β ἀπὸ G-25	++++	++++	––––	––––			
	++++	++++	++––	––––			

	++++	++++	++++	----	
Fraction B by G-25	++++	+++-	++++	----	1,13

Κλάσμα σαπ.
I ἀπὸ G-200
Fraction I by G-200

Κλάσμα σαπ.	++++	++--	----	----	
II ἀπὸ G-200	++++	++--	----	----	
	++++	+---	(+)---	----	
Fraction II by G-200	++++	+---	----	----	3,0

* Ἐπεξήγηση: ++++ νέκρωση δέρματος καὶ ὑποδορίου ἱστοῦ σὲ διάμετρο μεγαλύτερη ἀπὸ 1,5 έκατ.
* Legend: Skin and hypodermic tissue necrosis with a diameter bigger than 1,5 cm.
++-- Διάμετρος μικρότερη ἀπὸ 1,5 έκατ.
Diameter less than 1,5 cm.
++-- διάμετρος νέκρωσης 0,5-1 έκατ.
diameter 0,5-1 cm
+--- διάμετρος νέκρωσης 0,2-0,5 έκατ.
diameter 0,2-0,5 cm
---- καμία λύση δέρματος
Intact skin.

σὲ δεκαπλάσιο ὄγκο (0,5 κυβ. έκατ.) 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 ἰνδοχοιρίδια.
Influence of saponin and its fractions on the immunization of FMD-Vaccine in guinea pigs.

Ἐμβόλιο Ἀφθώδους Πυρετοῦ
Foot-and-mouth diseas vaccine

	χωρὶς σαπωνίνη witout saponin	Μὲ σαπωνίνη ἢ κλασμάτων αὐτῆς With saponin or its fractions						Μάρτυρες ἀντιγόνου
Dilution of saponin or its fractions		Διάλυμα σαπ. 40% Dilution of saponin 40%		Κλάσμα I G-200 Fract. I G-200		Κλάσμα II G-200 Fract. II G-200		Antigen Kontrols
Ἀραιώσεις σαπ. ἢ κλασμ.		1:80 (0,625 mg SAP)	1:160 (0,312 mg SAP)	1:5	1:10	1:40	1:80	
Λογάριθμος ἀραιώσεων ἐμβολίου. Logar. of vaccine dilution								
0,6	———	———	———	———	——+	———	——+	+++++
1,2	++++	———	——++	++++	++++	++++	++++	
1,8	++++	++++	++——	++++	++++	++++	++++	
ΠΔ.Ι.$_{50}$ /Κυβ. ἑκατ. PDGP$_{50}$/ml	0,125	0,031	0,062	0,125	0,160	0,125	0,160	

(A_{22})καὶ Ο-Πέπλου, στὴν ἐκτροπὴ τοῦ συμπληρώματος (ΕΣ) καὶ στὴν ὀροεξουδετέρωση, ἀφοῦ πρηγουμένως ἀδρανοποιήθηκαν οἱ ὀροὶ 30′ /56° C.

Γιὰ τὴν Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν οἱ ὀροὶ μόνον στὴν ἀραίωση 1:20. Ἡ ὀροεξουδετέρωση ἔγινε μὲ τὴν μικρομέθοδο (14). Οἱ ὀροὶ ἀραιώθηκαν μὲ λογάριθμο τοῦ 4 ἀπὸ 1:16 ἕως 1:1024. Ἀπὸ κάθε ἀραίωση ὀροῦ τοποθετήθηκε σὲ δύο βυθίσματα ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. σ' αὐτὸ προστέθηκε ἴσος ὄγκος ἀντιγόνου (ἰὸς A_{22} καὶ 0-Πέπλου ἀντίστοιχα) 50-100 $DCID_{50}$ ἀνὰ 0,05 κυβ. ἑκατ. Μετὰ ἀπὸ 1 ὥρα σὲ θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκε σὲ κάθε βύθισμα 0,05 κυβ. ἑκατ. κύτταρα IBRS (ἀριθμὸς κυττάρων $1,3 \times 10^6/1$ κυβ. ἑκατ.) μέσα σὲ ὑλικὸ Eagle μὲ τελικὸ ποσοστὸ ὀροῦ μόσχου 3,3%. Ἡ πλάκα σκεπάστηκε μὲ διαφανὴ κόλλα καὶ ἐπωάστηκε 48 ὧρες / 37° C. Γιὰ νὰ γίνει ἡ ἀνάγνωση τῆς ὀροεξουδετέρωσης, ξεσκεπάστηκαν οἱ πλάκες ἀδειάστηκε τὸ περιεχόμενο καὶ προστέθηκε στὰ βυθίσματα εἰδικὴ χρωστικὴ (Kristalviolett 0,1% μὲ 10% φορμόλη 37%). Μετὰ ἀπὸ 10 λεπτά, ξεπλύθηκαν οἱ πλάκες καὶ ἔγινε ἡ ἀνάγνωση. Ἐκεῖ ὅπου ἔδρασε ὁ ἰός, δηλαδὴ δὲν ἐξουδετερώθηκε ὁ ἰός, 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 οὐσιῶν τῆς σαπωνίνης βάσει μοριακοῦ βάρους. Τὰ μεγαλομόρια ἐκλύονται πρῶτα. Ἡ δυνατότητα διαχωρισμοῦ οὐσιῶν βάσει μοριακοῦ βάρους στὸ πήκτωμα G-200 εἶναι πολὺ πιὸ μεγάλη. Γι' αὐτό, μετὰ τὴν χρωματογραφία σὲ G-25, τὸ κλάσμα Α, ποὺ πρέπει κυρίως νὰ ἔχει τὶς περισσότερες μεγαλομορικαὲς οὐσίες ἐπαναχρωματογραφήθηκε σὲ G-200, ὅπου πήραμε τρεῖς καμπύλες.

Τὰ κλάσματα τῆς πρώτης καμπύλης (Ι) ἔχουν μιὰ θολάδα καὶ δὲν ἀφρίζουν. Τὰ κλάσματα τῆς καμπύλης ΙΙ ἔχουν τὸ χαρακτηριστικὸ χρῶμα τῆς σαπωνίνης (ξανθὸ-καφέ) καὶ ἀφρίζουν. Τὰ κλάσματα τῆς τρίτης καμπύλης (ΙΙΙ) 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, ὅτι ἡ διευκολυντικὴ ἰδιότητα τῆς σαπωνίνης βρίσκεται στὶς μεγαλομοριακὲς οὐσίες. Γι' αὐτὸ καὶ ἡ δική μας ἔρευνα κατευθύνθηκε στὴν μελέτη τῶν μεγαλομοριακῶν οὐσιῶν τῆς σαπωνίνης, ἤτοι ἐκείνων ποὺ πήραμε στὴν καμπύλη Ι καὶ ΙΙ ἀπὸ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25.

Βασικά, ἡ ἐξέταση τῶν κλασμάτων αὐτῶν (Ι καὶ ΙΙ) ὡς πρὸς τὴν αἱμόλυση, τὸν ἐρεθισμὸ καὶ τὴν νέκρωση, ἔγινε σὲ σύγκριση μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% καὶ μὲ τὰ κλάσματα Α καὶ Β τοῦ G-25 (βλέπε πίνακα 1 καὶ 2) ἐνῶ ὡς πρὸς τὴν ἐπίδραση αὐτῶν στὴν ἀνοσοποίηση συγκρίθηκαν μόνον μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% σὲ ὁρισμένη ποσότητα μέσα στὸ ἐμβόλιο (πίνακας 3).

Ὅπως φαίνεται στὸν πίνακα 1, ἡ σαπωνίνη 40% αἱμολύει καὶ στὴν ἀραίωση 1:640 ἤτοι σὲ ποσότητα οὐσίας σαπωνίνης 0,078 χιλιοστόγραμμα (mg).

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

Μεταξὺ τῶν κλασμάτων Ι καὶ ΙΙ τοῦ πηκτώματος G-200, τὸ πρῶτο δὲν αἱμολύει οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὄγκο, ἐνῶ τὸ δεύτερο (ΙΙ) δίνει σχεδὸν τὴν ἴδια αἱμόλυση μὲ τὸ κλάσμα Α τοῦ G-25. Δηλαδή, ἡ αἱμολυτικὴ ἰδιότητα βρίσκεται καὶ στὰ δύο κλάσματα τοῦ G-25, στὸ G-200 ὅμως ἀπομονώνεται στὰ κλάσματα τῆς καμπύλης ΙΙ, ἐνῶ οἱ μεγαλομοριακὲς οὐσίες ποὺ βρίσκονται στὴν καμπύλη Ι δὲν αἱμολύουν καθόλου.

Ἡ αἱμόλυση 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 αἱμόλυσης 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 αἱμόλυσε οὔτε στὸ αἱματοῦχο ἄγαρ.

Ὡς πρὸς τὴν ἐρεθιστικότητα καὶ τὴν νέκρωση τοῦ δέρματος καὶ τῶν ὑποδορίων ἱστῶν σὲ ἰνδοχοιρίδια, ὅπως φαίνεται στὸν πίνακα Νο 2, ἡ ποσότητα σαπωνίνης σὲ χιλιοστόγραμμα κατὰ δόση σαπωνίνης στὸ ἐμβόλιο (0,05 κυβ. ἑκατ. ἀνὰ σημεῖο ἐνοφθαλμισμοῦ) κυμαίνεται μεταξὺ 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 ἐρεθισμὸ καὶ νέκρωση οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὄγκο.

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

Ἐπίσης στὴν ὁροεξουδετέρωση, στὴν ἀραίωση 1:16, ἦσαν ὅλοι οἱ ὁροὶ ἀρνητικοὶ ὡς πρὸς τὸν ἰὸ 0-Πέπλου, ἐνῶ ὡς πρὸς τὸν ἰὸ Α-Ξάνθης, δηλαδὴ ὡς πρὸς τὸν ἰὸ 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%, ὅπου προστατεύονται καὶ τὰ τέσσερα ἰνδοχοιρίδια, δίνει κατὰ μέσο ὅρο χαμηλότερο τίτλο ἀντισωμάτων ἀπὸ τὸ ἐμβόλιο στὴν ἀραίωση 1:64 καὶ μὲ τὴν ἴδια ποσότητα σαπωνίνης ὅπου γενίκευσαν ὅλα τὰ ζῶα.

Ὅπως φαίνεται καὶ στοὺς πίνακες 3 καὶ 4, ὁ τίτλος ἀντισωμάτων στὴν ὁροεξουδετέρωση, 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 ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ὡς πρὸς τὸν ἰὸ Α.Π. τύπο A_{22} μετὰ ἀπὸ ἐμβολιασμὸ (μὲ καὶ χωρὶς σαπωνίνη) καὶ μόλυνση.
Title of neutralizing antibidies to FMDV type A_{22} in guinea pigs after vaccination (with or without saponin) and challenge.

Ἐμβόλιο Ἀφθώδους Πυρετοῦ

Λογάριθμος ἀραιώσεων ἐμβολίου Logarithm of vaccine Dilutions	Χωρὶς σαπωνίνη without saponin	Μὲ προσθήκη σαπωνίνης ἢ κλασμάτων της With saponin or its fractions						Μάρτυρες Kontrols
		Διάλυμα σαπ. 40% Dilution of sap. 40%		Κλασ. I G-200 Fract. I by G-200		Κλασ. 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	1,5
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 ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ἰνδοχοιριδίων. Ὁ ἀριθμὸς ἐκφράζει τὸ μέσο ὅρο τίτλου 4 ἰνδοχοιριδίων.
*Logaristhm of title of neutralizing antibodies in guinea pigs. The number is the mean titre from guinea pins.

Ὅπως φαίνεται (πίνακας 3), τὸ ἐμβόλιο χωρὶς προσθήκη σαπωνίνης ἔχει τίτλο Π.Δ.Ι.$_{50}$ 0,9 (0,125 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου).

Μὲ προσθήκη 0,312mg σαπωνίνης ἀπὸ τὰ διαλύματα 40% ἔχει τίτλο ΠΔΙ$_{50}$ 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 ἐνισχύουν τὴν ἀνοσοποιὸ δύναμη τοῦ ἐμβολίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ἔγινε προσπάθεια διαχωρισμοῦ τοῦ διευκολυντικοῦ παράγοντα τῆς σαπωνίνης ἀπὸ τὸν αἱμολυτικὸ 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, ἐξετάσαμε μόνον τὶς δύο πρῶτες. Συγκρίθηκαν αὐτὲς μὲ τὸ διάλυμα σαπωνίνης 40% στὴν αἱμόλυση, νέκρωση καὶ στὴν ἐνισχυτική των ἰδιότητα στὸ ἐμβόλιο ἀφθώδους πυρετοῦ (τύπος A_{22}).

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

Ἡ αἱμόλυση δοκιμάσθηκε συγκριτικὰ σὲ 3% ἐναιώρημα ἐρυθρῶν αἱμοσφαιρίων προβάτου καὶ σὲ αἱματοῦχο ἄγαρ (1% ἄγαρ μὲ 3% αἱμοσφαίρια προβάτου). Ὁ αἱμολυτικὸς τίτλος τῆς σαπωνίνης στὸ αἱματοῦχο ἄγαρ εἶναι 3 ἀραιώσεις ψηλότερα (μὲ λογάριθμο τοῦ 2) ἀπὸ ἐκεῖνον σὲ ἐναιώρημα ἐρυθρῶν. Γίνεται σκέψη ἀξιοποιήσεως τῆς μεθόδου στὴν ἀνίχνευση μικροποσοτήτων σαπωνίνης.

Ὁ 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 G200 δὲν προκαλεῖ νέκρωση οὔτε σὲ 10-πλάσιο ὄγκο.

Ὁ τίτλος ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων ἰνδοχοιριδίων μετὰ τὸν ἐμβολιασμὸ καὶ τὴν μόλυνση μὲ τὸν ἴδιο τύπο ἰοῦ Ἀφθώδης Πυρετοῦ (τύπος A_{22}), παρουσιάζει διακυμάνσεις καὶ δὲν ἔχει σχέση μὲ τὴν παρεχομένη προστασία.

Ἡ Π.Δ.Ι.$_{50}$ τοῦ ἐμβολίου ὡς πρὸς τὸν ἰὸ τοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ τύπου A_{22}, χωρὶς 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 ἀραίωση (μὲ 0,625mg σαπωνίνης κατὰ δόση ἐμβολίου) εἶναι 0,062 κυβ. ἑκατ. ἐμβολίου.

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–