

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 32, No 3 (1981)

Υπεύθυνοι σύμφωνα με το νόμο

ΙΣΙΟΚΤΗΤΗΣ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

Επιστημονικό Σωματείο άνωγειογραφούμενο, άριθ. άποφ. 5410/19.2.1975 Πρωτοδικείου 'Αθηνών.

Πρόεδρος γιά τό έτος 1981: Κων. Ταρλατζής

ΕΚΔΟΤΗΣ: 'Εκδίδεται υπό αίρετής πενταμελούς συντακτικής έπιτροπής (Σ.Ε.) μέλών τής Ε.Κ.Ε.

ΥΠ/ΝΟΣ ΣΥΝΤΑΞΕΩΣ: 'Ο Πρόεδρος τής Σ.Ε. Λουκάς Εύσταθίου, Ζαλοκώστα 30, Χαλάνδρι. Τηλ. 6823459

Μέλη Σν/κής 'Επ.: Χ. Παππούς Α Σέμάνης Ι. Δημητριάδης Σ. Κολάγης

Φωτοστοιχειοθεσία - 'Εκτύπωση: ΕΠΤΑΛΟΦΟΣ Α.Β.Ε.Ε.

'Αρδηγετού 12-16 'Αθήνα Τηλ. 9217513 - 9214820 ΤΟΠΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ: 'Αθήνα

Τοχ. Διεύθυνση:
Τοχ. Θορίς 407
Κέντρικο Ταχυδρομείο
'Αθήνα


Συνδρομές:

'Ετησία έπιστολική	δρχ.	500
'Ετησία έξιμηνιακή	×	1000
'Ετησία φοιτητών ήμεδαπής	×	300
'Ετησία φοιτητών άλλουδαπής	×	500
Τιμή έκαστου τεύχους	×	200
Ίδρύματα κ.λπ.	×	1000

Address: P.O.B. 407
Central Post Office
Athens - Greece

Redaction: L. Efstathiou
Zalokosta 30,
Halandri
Greece

Subscription rates:
(Foreign Countries)
\$ U.S.A. 20 per year.



Δελτίον
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΠΕΡΙΟΔΟΣ Β
ΤΟΜΟΣ 32
ΤΕΥΧΟΣ 3

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ
1981

Bulletin
OF THE HELLENIC
VETERINARY MEDICAL SOCIETY

QUARTERLY
SECOND PERIOD
VOLUME 32
No 3

JULY - SEPTEMBER
1981

'Επιταγές και έμβάσματα άποστέλλονται έπ' όνόματι κ. Στ. Μάλαρη κτην. 'Ινστ. 'Υγιεινής και τεχνολογίας Τροφίμων, 'Ιερά όδός 75, Τ.Τ. 303 'Αθήνα. Μελέτες, έπιστολές κ.λπ. άποστέλλονται στόν κ. Α. Εύσταθίου, Κτηνιατρικό 'Ινστιτούτο Φυσιολογίας, 'Αναπαραγωγής και Διατροφής Ζώων, Ναυπόλεως 9.25, 'Αγία Παρασκευή 'Αττικής.

BHK cell suspension cultures and foot and mouth disease virus production for vaccines

Χ. ΠΑΠΠΟΥΣ, Π. ΒΕΡΜΠΕΛΗΣ, Ι. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

doi: [10.12681/jhvms.21497](https://doi.org/10.12681/jhvms.21497)

Copyright © 2019, Χ. ΠΑΠΠΟΥΣ, Π. ΒΕΡΜΠΕΛΗΣ, Ι. 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:

ΠΑΠΠΟΥΣ Χ., ΒΕΡΜΠΕΛΗΣ Π., & ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ Ι. (2019). BHK cell suspension cultures and foot and mouth disease virus production for vaccines. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 32(3), 195–205. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21497>

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΒΗΚ ΑΙΩΡΗΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΟΥ ΑΦΘΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΩΝ*

Υπό

Χ. ΠΑΠΠΟΥ*, Π. ΒΕΡΜΠΕΛΗ*, Ι. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗ*

BHK CELL SUSPENSION CULTURES AND FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS PRODUCTION FOR VACCINES

By

CH. PAPPOUS, P. VERBELIS, I. DIMITRIADIS

SUMMARY

Using the BHK cell suspension culture method in fermentor of 100 lt. capacity 1,5 – 3 × 10⁶ cells/ml are obtained in 48 – 72 hours.

The cells maintain their susceptibility to the vaccine strains of F.M.D. virus and the parameters of the virus produced on such cells are satisfactory.

Vaccines prepared with this virus induced good immunity for bovines and sheep.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἡ χρησιμοποίηση καλλιερχειῶν κυττάρων ΒΗΚ – 21, C₁₃ γιά παραγωγή τοῦ Ἀφθώδους Πυρετοῦ (Α.Π.) ἀποτελεῖ σταθμὸ στὴν παραγωγή ἀντιαφθωδικῶν ἐμβολίων.

Οἱ Mac Pherson καὶ Stoker¹ περιγράφουν τὸ 1962 τὴν προέλευση τῆς κυτταρικῆς γραμμῆς ΒΗΚ – 21 (Baby Hamster Kidney). Τὸν ἴδιο χρόνο οἱ Mowatt καὶ Charpmann² ἀποδεικνύουν τὴν εὐαισθησία τοῦ κλώνου C₁₃ (Clone) τῆς κυτταρικῆς αὐτῆς γραμμῆς στὸν ἰὸ Α.Π. Στὴν συνέχεια, ἡ κυτταρικὴ γραμμὴ ΒΗΚ – 21, C₁₃ χρησιμοποιεῖται εὐρύτατα γιά τὴν καλλιέργεια τοῦ ἰοῦ Α.Π. σὲ μεγάλη κλίμακα, εἴτε σὲ μορφή μονόστρωτων (Monolayer) κυτταροκαλλιερχειῶν σὲ περιστρεφόμενες φιάλες (Polatnik καὶ Bachrach³ 1964, Ubertini καὶ συν⁴ 1967), εἴτε σὲ μορφή καλλιερχειῶν αἰωρήσεως (Capstick καὶ συν.⁵ 1962 Telling καὶ Ellsworth⁶ 1965) μὲ σκοπὸ τὴν παραγωγή ἀντιαφθωδικῶν ἐμβολίων.

* Κτηνιατρικὸ Ἰνστιτούτο Ἀφθώδους Πυρετοῦ, Ἀγ. Παρασκευῆ Ἀττικῆς.
Institute FMD. Ag. Paraskevi, Attiki. Greece.

* Ανακοινώθηκε στὸ Πανελλήνιο Συνέδριο Γεωτεχνικῶν Ἐρευνῶν – Καλλιθέα Χαλκιδικῆς 5-8 Μαΐου 1981.

Με την παρέλευση του χρόνου τὰ περισσότερα Ἴνστιτούτα παραγωγῆς ἀντιαφθωδικῶν ἐμβολίων ἐγκατέλειψαν τὶς παλαιότερες μεθόδους παραγωγῆς ἰοῦ δπως, φυσικοῦ ἰοῦ μὲ ἐνδογλωσσική μόλυνση βοοειδῶν ἢ ἰοῦ καλλιέργειας σὲ ἐπιθήλιο γλώσσας βοοειδῶν (Μέθοδος Frenkel) σὲ κύτταρα νεφρῶν μόσχου ἢ χοίρου καὶ προσάρμοσαν τὶς μεθόδους παραγωγῆς του σὲ κύτταρα ΒΗΚ αἰωρήσεως ἐντὸς ζυμωτῶν (Fermentors) διάφορης χωρητικότητας (500 — 1000 — 2000 λ. ἢ καὶ μεγαλύτερων).

Τὸ Ἴνστιτούτο Ἀφθώδους Πυρετοῦ χρησιμοποιεῖ ἀπὸ τὸ 1964 μονόστοιβες κυτταροκαλλιέργειες ΒΗΚ σὲ περιστρεφόμενες φιάλες γιὰ παραγωγή ἰοῦ Α.Π. καὶ παρασκευὴ ἀντιαφθωδικῶν ἐμβολίων¹. Τὸ 1974 τὸ Ἴνστιτούτο ἐξοπλίστηκε μὲ ζυμωτὲς καὶ ἄρχισε παράλληλα ἡ πειραματικὴ παραγωγή ἰοῦ Α.Π. σὲ κύτταρα ΒΗΚ αἰωρήσεως. Τὰ ἀποτελέσματα τῆς ἔρευνας αὐτῆς ἐκθέτουμε στὴν παρούσα ἐργασία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

1. Ἐξοπλισμός: Στὶς μικρὲς καλλιέργειες κυττάρων αἰωρήσεως, πού χρησιμεύουν γιὰ τὴν ἀνανέωση τῆς κυτταρικῆς γραμμῆς καὶ γιὰ τὴν παραγωγή κυττάρων σπορᾶς τῶν μεγάλων καλλιιεργειῶν, χρησιμοποιοῦνται ὑάλινοι ζυμωτὲς τύπου φιαλῶν Pirbright τῶν 500 κ.έκ. ἢ φιαλῶν Belco τοῦ ἐνὸς καὶ δέκα λίτρων, ἐφοδιασμένων μὲ μαγνητικὸ ἀναδευτήρα ἐπικαλυμμένο μὲ Teflon. Στὶς μεγάλες καλλιέργειες χρησιμοποιοῦνται ἕνας ζυμωτὴς ὠφέλιμης χωρητικότητας 20 λίτρων καὶ δύο τῶν 100 λίτρων. Οἱ ζυμωτὲς αὐτοὶ εἶναι κατασκευασμένοι ἀπὸ εἰδικὸ ἀνοξειδωτὸ χάλυβα, φέρουν ἠλεκτρόδια αὐτομάτου ρυθμίσεως Ph καὶ θερμοκρασίας, παροχῆς ἀέρα καὶ CO₂ στὸ βάθος καὶ τὴν ἐπιφάνεια τῆς καλλιέργειας, ὅπως ἐπίσης καὶ σύστημα ἀναδεύσεως τῶν κυττάρων διὰ δονήσεων ρυθμιζομένου πλάτους (Vibromixer).

2. Κυτταρική γραμμὴ ΒΗΚ

Χρησιμοποιεῖται τὸ στέλεχος κυττάρων ΒΗΚ αἰωρήσεως πού προέρχεται ἀπὸ τὸ Ζωοπροφυλακτικὸ Ἴνστιτούτο Πάδοβας*. Μὲ τὸ ἀρχικὸ καλλιέργημα (100 κ.έκ. περίπου) πραγματοποιήσαμε δύο ἀκόμη διόδους αἰωρήσεως γιὰ τὸν σχηματισμὸ ἰκανοῦ ἀποθέματος κυττάρων.

Τὰ κύτταρα αὐτὰ ὕστερα ἀπὸ φυγοκέντρωση καὶ συμπύκνωση σὲ ὑλικὸ συντηρήσεως [(55% Eagle ÷ 25% ὀρὸς μόσχου ÷ 10% TPB ÷ 10% DMSO (-Dimethyl Sulfoxide 50%)], διανεμήθηκαν σὲ φύσιγγες τοῦ 1 κ.έκ. περίπου 15 × 10⁶ κύτταρα κατὰ κ.έκ., καὶ τοποθετήθηκαν σὲ ὑγρὸ ἄζωτο.

3. Θρεπτικὰ ὑλικά

α) Ὑλικὸ ἀναπτύξεως κυττάρων: Χρησιμοποιεῖται γιὰ ὅλα τὰ εἶδη καλλιιεργειῶν (μικρῶν-μεγάλων) τὸ ὑλικὸ τῶν Mac Pherson καὶ Stoker¹ πού εἶναι ὑλικὸ Eagle ἐντὸς Earle (B.M.E.), τροποποιημένο γιὰ νὰ περιέχει διπλάσια ποσότητα ἀμινοξέων, μὲ 10% T.P.B. (Tryphtose Phosphate Broth) καὶ 10% ὀρὸ

* Στὸ Ἴνστιτούτο αὐτὸ ὁ πρῶτος ἀπὸ μᾶς παρακολούθησε κυτταροκαλλιέργειες στὸν τομέα Α.Π. ὑπὸ τὴν καθοδήγηση τοῦ καθηγητοῦ R. ZOLETTO.

μόσχου. Δεν προσθέτουμε Edifas και αντιφρῶδες. Τὸ ΡΗ τοῦ ὑλικοῦ ἀναπτύξεως ρυθμίζεται μεταξύ 7,4 — 7,6 μὲ CO₂. Τὸ ὑλικὸ ὑφίσταται διπλὴ διήθηση διὰ φίλτρων SEITZ, EKS και EKS₁.

β) Ὑλικὸ συντηρήσεως κυττάρων: Ὡς ὑλικὸ συντηρήσεως κυττάρων ποὺ προορίζονται γιὰ καλλιέργεια τοῦ ἰοῦ Α.Π. χρησιμοποιεῖται ὑλικὸ HANKS μὲ (2‰) ἐνζυματικὸ ὑδρόλυμα λακταλβουμίνης ὅπως χρησιμοποιεῖται στὸ Ἴνστιτούτο Πάδοβας. Τὸ ὑλικὸ διηθεῖται σὲ φίλτρα SEITZ, EKS.

Στὰ παραπάνω ὑλικά καλλιέργειας προστίθενται ἀντιβιοτικά ὡς ἑξῆς: Πενικιλίνη 0,13 γρ., Στρεπτομυκίνη 0,20 γρ., Νεομυκίνη ἢ Καναμυκίνη 0,015 γρ. καὶ Fungizone 0,25 γρ./λ.

4. Ἴος Α.Π.

Τὰ στελέχη ἰοῦ ποὺ χρησιμοποιοῦνται γιὰ τὴν παραγωγή ἐμβολίου εἶναι:

- Ἴος O₁ Πέπλου, στέλεχος ἐπιζωοτίας Α.Π. 1972.
- Ἴος Α, στέλεχος ἐστίας Α.Π. 1977 στὸ Πλατὺ Ἴμμαθίας.
- Ἴος C₁ Detmold ποὺ μᾶς προμήθευσε τὸ Ἴνστιτούτο Pirbright.

Τὰ στελέχη αὐτὰ συντηροῦνται ὑπὸ μορφὴ ἀφθῶν σὲ συντηρητικὸ ὑλικὸ στοὺς — 20°C καὶ ὑφίστανται περιοδικὰ ἀνανέωση σὲ βοοειδῆ. Τὰ στελέχη αὐτὰ προσαρμόζονται σὲ μονόστοιβα κυτταροκαλλιεργήματα ΒΗΚ περιστρεφόμενων φιαλῶν τῆς ἰδίας προελεύσεως μὲ τὰ κύτταρα ΒΗΚ αἰωρήσεως καὶ παρασκευάζεται ἰκανὴ ποσότητα ἰοῦ σπορᾶς γιὰ τὶς ἀνάγκες ἐνοφθαλμισμού τῶν κυτταροκαλλιεργείων αἰωρήσεως.

5. Μέθοδος καλλιέργειας κυττάρων

α) Μικρὲς καλλιέργειες

Γιὰ τὴν ἔναρξη τῆς καλλιέργειας λαμβάνονται 1-2 φύσιγγες ἀπὸ τὸ ἀπόθεμα τῶν κυττάρων στὸ ὑγρὸ ἄζωτο καὶ ἀποψύχονται ἀμέσως σὲ ὑδατόλουτρο 37°C. Τὰ κύτταρα φυγοκεντροῦνται γιὰ τὴν ἀφαίρεση τοῦ συντηρητικοῦ τῶν ὑλικοῦ καὶ στὴν συνέχεια ἐνοφθαλμίζονται σὲ θρεπτικὸ ὑλικὸ ἐντὸς φιάλης τύπου Pirbright γιὰ ἀπ' εὐθείας ἔναρξη καλλιέργειας κυττάρων αἰωρήσεως συνήθως ὁμοῦ γίνονται προηγουμένως 1-2 δίοδοι τῶν κυττάρων αὐτῶν σὲ στατικὴ καλλιέργεια ἐντὸς φιαλῶν Brockway καὶ Roux καὶ μετὰ πραγματοποιεῖται ἡ δίοδος σὲ ζυμωτὲς γιὰ καλλιέργεια σὲ αἴωρηση.

Πραγματοποιοῦνται 2-3 δίοδοι αἰωρήσεως σὲ φιάλες τύπου Pirbright καὶ μετὰ, συνεχῆς δίοδοι ἀνά 48ωρο μικρὲς καλλιέργειες τῶν 500 κ.έκ. σὲ φιάλες τύπου Belco 1 λ. Τὰ κυτταροκαλλιεργήματα αὐτὰ συντηροῦνται σὲ ÷ 4°C μέχρι 20 ἡμέρες τὸ πολὺ καὶ χρησιμεύουν γιὰ τὸ ξεκίνημα τῶν μεγάλων καλλιεργείων.

α) Μεγάλες καλλιέργειες. Πρὸς τὸν σκοπὸν αὐτὸ πραγματοποιεῖται δίοδος κυττάρων σὲ φιάλες τύπου Belco 10 λ. παρασκευάζεται ποσότητα ἐναιωρήματος κυττάρων 2-4 λ., ποὺ χρησιμεύει γιὰ σπορὰ καλλιέργειας τοῦ ζυμωτῆ τῶν 20 λ. Μετὰ 48-72 ὥρες καλλιέργεια, τὰ κύτταρα τοῦ ζυμωτῆ αὐτοῦ διανεμόν-

ται σὲ δύο ἄλλους τῶν 100 λ. προστίθεται ὕλικό ἀναπτύξεως 60 λ. περίπου στὸν καθένα καὶ μετὰ 48-72 ὥρες λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων 140 λ. περίπου, πού προορίζεται γιὰ τὴν παραγωγή ἰοῦ.

6. Παραγωγή ἰοῦ Α.Π.

Μὲ τὸ πέρας τῆς καλλιέργειας τὰ κύτταρα συλλέγονται σὲ ὑάλινα δοχεῖα ψύχονται ἀμέσως σὲ κρῦο νερὸ καὶ τοποθετοῦνται σὲ + 4°C ὥστε νὰ κατακαθίσουν πλήρως στὸν πυθμένα τοῦ δοχείου. Ἀφαιρεῖται τὸ ὑπερκείμενο ὕλικό μὲ ἀντλία καὶ σὲ ζυμωτὴ πού περιέχει 100 λ. ὕλικό συντηρήσεως κυττάρων (Hanks) προστίθενται τὰ κύτταρα ὥστε τὸ τελικὸ ἐναιώρημα νὰ περιέχει 2 — 2.500.000 κύτταρα/κ.έκ.

Προστίθεται στὴ συνέχεια ὁ ἰὸς Α.Π., πρόσφατης καλλιέργειας σὲ μονόστοιβα κυτταροκαλλιεργήματα ΒΗΚ, σὲ ἀναλογία 0,5—2,5 μονάδες κυτταροπαθογόνου δράσης 50% (TCID₅₀)/κύτταρο ἢ 3—4% ἐναιώρημα ἰοῦ, ὕστερα δὲ ἀπὸ 24 ὥρες περίπου, ὁ ἰὸς ἔχει καταστρέψει σχεδὸν ὄλα τὰ κύτταρα, ὁπότε γίνεται συλλογὴ τοῦ ὕλικου αὐτοῦ πού χρησιμεύει γιὰ παρασκευὴ ἐμβολίου.

7. Ἐλεγχος ἀποτελεσματικότητας ἐμβολίων

ι) Βοοειδῆ

Χρησιμοποιοῦνται βοοειδῆ πλήρως εὐαίσθητα στὸν Α.Π. Πρὸ τῆς χρησιμοποίησέως τῶν ἐλέγχονται γιὰ τυχὸν ὑπαρξὴ ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων, ἐναντι τῶν τύπων τοῦ ἰοῦ πού περιέχονται στὰ ὑπὸ ἔλεγχου ἐμβόλια.

Ἐμβολιάζονται 5 βοοειδῆ μὲ κανονικὴ δόση ἐμβολίου (5 κ.έκ.) καὶ μετὰ 21 μέρες ἐλέγχεται ἡ κτηθεῖσα ἀνοσία ἐναντι ἐνὸς τῶν τύπων τοῦ ἰοῦ πού περιέχονται στὸ ἐμβόλιο, μὲ μόλυνση τῶν ἐμβολιασθέντων βοοειδῶν κι ἓνα μάρτυρα, μὲ ἰὸ Α.Π. 10⁴ DL₅₀/0,10 κ.έκ. ἐνδογλωσσικῶς σὲ 2 σημεία. Ἐπίσης ἐλέγχεται ὁ τίτλος τῶν ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων τῶν ἐμβολιασθέντων βοοειδῶν. Ἐλέγχθησαν ἔτσι δύο σειρές διδυνάμου ἐμβολίου τύπου ΑΟ.

ii) Πρόβατα. 6 ἀμνοὶ ἡλικίας 9 μηνῶν περίπου ἐμβολιάσθησαν μὲ τριδύναμο ἐμβόλιο Α Ο C κι' ἔγινε ἔλεγχος ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων πρὸ καὶ 21 ἡμέρες μετὰ τὸν ἐμβολιασμό τῶν.

iii) Ἰνδόχοιροι. Ὅλα τὰ ἀναφερθέντα ἐμβόλια ἐλέγχθησαν καὶ σὲ ἰνδόχοιρους. Προσδιορίστηκε ἡ προστατευτικὴ δόση ἰνδοχοίρου 50% (ΠΔ₅₀) ἐναντι τῶν τύπων τοῦ ἰοῦ πού περιείχαν τὰ ἐμβόλια⁸.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Καλλιέργειες κυττάρων: Στὸν πίνακα I καταχωροῦνται τὰ ἀποτελέσματα 20 καλλιεργημάτων γιὰ κάθε τύπο ζυμωτοῦ.

Ἡ παρακολούθηση τῆς ἀναπτύξεως καὶ ζωτικότητος τῶν κυττάρων, πραγματοποιεῖται μὲ καταμέτρηση αὐτῶν σὲ αἰμοκυττόμετρο τύπου ΤΟΜΑ, ὕστερα ἀπὸ χρώση μὲ Trypan Blue.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Αποτελέσματα ανάπτυξεως κυττάρων ΒΗΚ₂₁ εν αίωρησει
Results of ΒΗΚ₂₁ cell growth in suspension

Ποσότητα Volume	Αριθμός καλλιεργημάτων Number of cultures	Έναρξη** Starting	Καλλιέργεια * Cultivation				72 ώρων hours	Συντελεστής ratio
			24 ώρων hours	Συντελεστής*** ratio	48 hours	Συντελεστής ratio		
0.3 - 0.500 lt	6	24 (17.5-30)	108.7 (60-202.5)	4.53 (1.85-6.75)	293.7 (200-400)	12.23 (9.09-15.53)		
	14	47.6 (35-65)	138.2 (100-210)	2.9 (1.66-6)	323.4 (235-395)	6.8 (3.9-9.9)		
2 - 4 lt	10	27.8 (21-30)	74.75 (55-120)	2.68 (1.66-4.8)	205.5 (130-300)	7.39 (5-14.28)		
	10	42.2 (32-50)	81.85 (50-150)	1.94 (1.11-3)	245.75 (170-375)	5.82 (4.11-7.5)		
15 - 20 lt	4	26.1 (22-30)	69.4 (47.5-110)	2.65 (1.58-4)	125.4 (91.5-150)	4.8 (4.1-6)		
	16	54.84 (31-92.5)	121.81 (57.5-232.5)	2.22 (1.44-6.71)	239.22 (137.5-375)	4.36 (3.25-7.85)		
70 - 80 lt	9	24.40 (17.5-30)	51.77 (32.5-66)	2.12 (1.3-3.13)	119.2 (75-155)	4.88 (3-7.42)	204.75 (150-272.5)	8.39 (6-15)
	11	43 (31-62.5)	84.45 (42.5-122.5)	1.96 (1.21-2.77)	218.5 (151-300)	5.08 (2.68-7.05)		

* 20 καλλιεργήματα για κάθε τύπο ζυμοποτιού

20 cultures for each kind of vessel.

** Μέσος όρος και σε παρένθεση ελάχιστος και μέγιστος αριθμός κυττάρων $\times 10^4$ /κ.έκ.

Mean and in parentheses range of cells $\times 10^4$ /ml.

*** Συντελεστής ανάπτυξεως κυττάρων = άριθ. αναπτυχθέντων κυττάρων/άριθ. κυττάρων σποράς

1. Μικρές καλλιέργειες

Βασικό παράγοντα στις καλλιέργειες κυττάρων αίωρήσεως αποτελεί το Ph του υλικού ανάπτυξεως. Στην αρχή της καλλιέργειας το Ph έχει τάση να ανέρχεται λόγω της αναδεύσεως του υλικού. Τα κύτταρα δέν μπορούν να το σταθεροποιήσουν λόγω της φάσεως προσαρμογής των (Lag Phase) και της περιορισμένης ανάπτυξεως των (έναρξη πολλαπλασιασμού). Γι' αυτό κατά το πρώτο 24ωρο ή ανάδευση ρυθμίζεται σε λίγες στροφές 160/1' και σφραγίζονται τα στόμια του ζυμωτού με ελαστικά πώματα. Μετά, λόγω του έντονου πολλαπλασιασμού των κυττάρων, το Ph κατέρχεται προς το όξινο, τότε αυξάνεται ο αριθμός των στροφών αναδεύσεως σε 200/1' και αντικαθίστανται ένα ή και τα δύο ελαστικά πώματα του ζυμωτού (Belco) με πώματα γάζας, ώστε με τον εμπειρικό αυτό τρόπο διελεύσεως άερα στο ζυμωτή να διατηρηθεί το Ph σε άνεκτά για την ζωτικότητα των κυττάρων δρια (έως 6,8) και το επόμενο 24ωρο.

Στό πρώτο τύπο μικρής καλλιέργειας 0.3 — 0.5 λ. παρατηρούμε ότι, όταν γίνεται σπορά της καλλιέργειας με $20-30 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. ο μέσος όρος συντελεστού ανάπτυξεως κυττάρων είναι στις 24 και 48 ώρες 4.53 και 12.23 αντίστοιχα και ο τελικός αριθμός κυττάρων κατά μέσο όρο είναι $293,7 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. Όταν η σπορά γίνεται με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, κατά μέσο όρο $47,6 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ., τότε ο συντελεστής ανάπτυξεως των κυττάρων είναι 2,9 και 6,8 αντίστοιχα στα πάρα πάνω χρονικά διαστήματα και ο τελικός αριθμός κυττάρων κατά μέσο όρο είναι $323,4 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ.

Στις μεγαλύτερες καλλιέργειες εντός φιαλών Belco 10 λ. (ποσότητα κυτταροκαλλιεργημάτων 2—4 λ./φιάλη) με αριθμό κυττάρων σποράς $20 - 30 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. ο μέσος όρος συντελεστού ανάπτυξεως κυττάρων είναι στις 24 και 48 ώρες 2,68 και 7,39 αντίστοιχα και ο τελικός αριθμός κυττάρων είναι $205,5 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. Με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σποράς — μέσος όρος $42,2 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ., οι συντελεστές ανάπτυξεως κυττάρων είναι 1,94 και 5,82 αντίστοιχα στα ίδια χρονικά διαστήματα με τελικό αριθμό κυττάρων $245,75 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ.

Παρατηρείται δηλαδή ότι: με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σποράς ειτυχνάνονται μικρότεροι συντελεστές ανάπτυξεως αυτών και στους δύο τύπους μικρών καλλιεργιών. Ακόμη στους δύο αυτούς τύπους καλλιεργιών ο τελικός αριθμός κυττάρων κατά την συλλογή των, είναι μεγαλύτερος όταν είναι αυξημένος ο αριθμός κυττάρων σποράς.

2. Καλλιέργειες σε μεγάλους ζημωτές

Η περιεκτικότητα σε κύτταρα μπορεί τελικώς σε 48 ώρες, να φθάσει έως 400×10^4 κύτταρα/κ.έκ.

Λόγω κατασκευής του συστήματος αναδεύσεως, ή ανάδευση των κυττάρων παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας κι' ύστερα από πειραματικές καλλιέργειες έχει ρυθμιστεί σε ώρισμένο πλάτος δονήσεως ξεχω-

ριστά για κάθε ζυμωτή. Στόν ζυμωτή τών 20 λ. όταν γίνεται ή σπορά καλλιέργειας με $20 - 30 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. ό μέσος όρος συντελεστού, ανάπτυξεως κυττάρων είναι στις 24 και 48 ώρες 2,65 και 4,8 αντίστοιχα και ό τελικός αριθμός κυττάρων κατά μέσο όρο $125,4 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ.

Μέ μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σποράς, μέσος όρος $54,84 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ., ό συντελεστής ανάπτυξεως κυττάρων είναι 2,22 και 4,36 στά πιό πάνω χρονικά διαστήματα και ό τελικός αριθμός κυττάρων είναι $239,22 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. Κι εδώ οί συντελεστές ανάπτυξεως είναι μικρότεροι όταν ό αριθμός κυττάρων σποράς είναι πάνω από 30×10^4 κύτταρα/κ.έκ. (κατά μέσο όρο $54,84 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ.).

Ό τελικός αριθμός κυττάρων πού συλλέγεται είναι ικανοποιητικός ($137,5 - 375 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ.). Τό ίδιο περίπου συμβαίνει και στούς ζυμωτές τών 100 λ., γι' αυτό όταν ή έναρξη τής καλλιέργειας γίνεται με $20 - 30 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. παρατείνεται ή καλλιέργεια συνήθως έως 72 ώρες ώστε να φθάσει ό τελικός αριθμός κυττάρων σε ικανοποιητικά όρια για συλλογή, μέσος όρος $204,75 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. Ένω για μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σποράς τό 48ωρο τής καλλιέργειας είναι αρκετό για να πραγματοποιηθεί ή συλλογή τών κυττάρων. Μέσος όρος $218,5 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. Έτσι ή συνεχής λειτουργία τού ζυμωτού τών 20 λ. για παραγωγή κυττάρων σποράς τών δύο μεγαλύτερων ζυμωτών, επιτρέπει τήν παραγωγή 70 - 80 λ. έναιωρήματος κυττάρων ανά ζυμωτήν, με $150 - 300 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. ανά 2ήμερο ή 3ήμερο. Τά κύτταρα συλλέγονται σε ύάλινα δοχεία τά όποια τοποθετούνται σε $\pm 4^\circ\text{C}$. Παραμονή αυτών επί 24ωρο στό ψυγείο δέν είναι αρκετή για τήν καθίζηση τών κυττάρων στόν πυθμένα τών δοχείων. Χρειάζεται 48ωρος παραμονή για να κατακαθήσουν πλήρως τά κύτταρα. Τότε τό υπερκείμενο υλικό πού αφαιρείται στη συνέχεια, περιέχει ελάχιστα αίωρούμενα κύτταρα $< 20 \times 10^4$ κύτταρα/κ.έκ. κι' έτσι ή απόλεια κυττάρων είναι ελάχιστη.

B. Παραγωγή ιού Α.Π.

Τά κύτταρα επαναιωρούνται σε υλικό συντηρήσεως Hanks: ($\text{Ph} = 7,4 - 7,6$) εντός μεγάλου ζυμωτού ώστε ό αριθμός των να είναι περίπου $2 - 2,5 \times 10^6$ κύτταρα/κ.έκ. υλικού και προστίθεται ιός Α.Π., πρόσφατης παρασκευής σε μονόστοιβα κυτταροκαλλιέργηματα ΒΗΚ. Λόγω τού ύψηλου αριθμού κυττάρων, τό Ph τού υλικού κατέρχεται κατά τις πρώτες ώρες τής καλλιέργειας. Ρυθμίζεται με τή βοήθεια ήλεκτροδίου τό Ph έτσι, ώστε με τήν παροχή άερα βάρους να μήν κατέρχεται $<$ τού 7,2. Έτσι άποφεύγεται ή όξίνιση τού υλικού πού είναι επιζήμια για τήν άκεραιότητα τού ιού Α.Π. Η καλλιέργεια τού ιού διαρκεί περίπου 24 ώρες. Τά κύτταρα καταστρέφονται, στη μικροσκοπική εξέταση τά νεκρά παίρνουν τό χρώμα τής χρωστικής (Trypan Blue) και ό ιός συλλέγεται όταν στό καλλιέργημα δέν ύπάρχουν παρά ελάχιστα ζώντα κύτταρα. Έπακολουθεί ή συνήθης έπεξεργασία τού ιού για τήν παρασκευή έμβολίων. Με 140 λ. έναιωρήματος κυττάρων παράγονται 100 λ. περίπου ιού Α.Π. με τόν όποιο παρασκευάζεται μονοδύναμο άντιαφθωδικό έμβόλιο 20.000 δό-

σεων περίπου. Οί παράμετροι του ιού Α.Π. που παράγεται επί κυττάρων ΒΗΚ αίωρήσεως είναι στά ίδια περίπου όρια με αυτές του ιού που παράγεται σε μονόστοιβα κυτταροκαλλιεργήματα, διατηρείται δηλαδή ή ευαισθησία των κυττάρων στα έμβολιαστικά στελέχη του Α.Π. Ο₁, Α πλατύ και C₁ Detmold. Οί τίτλοι του παραχθέντος ιού έχουν ως εξής:

- Έκτροπή του συμπληρώματος: Αιμόλυση 50% = 0,50 κ.έκ. C' ¹/₂₅.
- Κυτταροπαθογόνος δράση (DICT₅₀) = $10^{-7} - 10^{-8}$ /κ.έκ.
- Μονάδες σχηματισμού πλακών (PFU₅₀) = $10^{-7} - 10^{-8}$ /κ.έκ.
- Θανατηφόρος δόση νεογ. μυών (DL₅₀) = $10^{-6.5} - 10^{-8.5}$ /κ.έκ.

Αυτές οί παράμετροι αποτελούν ένδείξεις μόνο της ποιότητας του ιού Α.Π. Ό έλεγχος της ανοσοποιητικής ικανότητας των παραγομένων με τέτοιο ιό εμβολίων σε πειραματόζωα και ιδίως βοοειδή, αποτελεί τó τελικό κριτήριο για την ποιότητα των εμβολίων αυτών.

Γ. Έλεγχοι εμβολίων

Στόν πίνακα II αναφέρονται τά δεδομένα έλέγχων δύο σειρών διδύναμου άντιαφθωδικού εμβολίου τύπου ΑΟ και μίας σειράς τριδύναμου τύπου ΑΟC.

1. Προστατευτική δόση ίνδοχοίρων 50%

Όπως φαίνεται στόν πίνακα II ή ΠΔΙ₅₀ στά διδύναμα έμβόλια είναι για τόν τύπο Α = 0,06 και 0,08 κ.έκ. εμβολίου και για τόν τύπο Ο 0,12 και 0,20 κ.έκ. εμβολίου. Στο τριδύναμο έμβόλιο ή ΠΔΙ₅₀ για τόν τύπο Α είναι 0,48 για τόν Ο = 0,12 και για τόν τύπο C = 0,20 κ.έκ. εμβολίου. Τά δεδομένα αυτά μās δείχνουν ότι τά έμβόλια που παράγονται με ιό καλλιεργηθέντα σε κύτταρα ΒΗΚ αίωρήσεως είναι στά ίδια όρια προστασίας ίνδοχοίρων με τά παρασκευαζόμενα με ιό καλλιέργειας σε μονόστοιβα κύτταρα ΒΗΚ.

2. Έλεγχος αποτελεσματικότητας σε βοοειδή

Έλέγχθηκαν σε βοοειδή δύο σειρές διδύναμου εμβολίου. Στη μιά σειρά, ή μόλυνση των βοοειδών έγινε με ιό Α. Τά 5 έμβολιασθέντα βοοειδή άντέστησαν στη μόλυνση, προστασία 100%, ενώ ό μάρτυρας του ιού εγενίκευσε. Ό άλλη σειρά έλέγχθηκε με ιό Ο και 4 έμβολιασθέντα βοοειδή άντέστησαν στη μόλυνση, προστασία 80%, ένα έμβολιασθέν και ό μάρτυρας εγενίκευσαν. Παρατηρούμε δηλαδή ότι τά έλεγχθέντα έμβόλια προστατεύουν ίκανοποιητικά τά βοοειδή που αποτελούν τó πρότυπο πειραματόζωων, ως κατ' έξοχήν ευαίσθητα στόν Α.Π., για τόν έλεγχο αποτελεσματικότητας των άντιαφθωδικών εμβολίων.

Ό στάθμη των όροεξουδετερωτικών άντισωμάτων των έμβολιασθέντων βοοειδών είναι ύψηλή· οί μέσοι όροι των τίτλων των δύο σειρών εμβολίου είναι: για τόν τύπο Ο = $10^{-1,90}$ και $10^{-1,99}$, για τόν τύπο Α = $10^{-2,02}$ και $10^{-2,19}$

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ

Αποτελέσματα Έλεγχων έμβολίων Α.Π. σε βοοειδή πρόβατα και ινδοχοίρους

Data of FMD vaccine control in bovine, sheep and guineapigs

Έμβολια Vaccines		Βοοειδή Bovine No	Τίτλος οξοεξουδετερωτικών άντισωμάτων Serum		Ίος ένο- φθαλμιμοῦ Challenge Virus	Αλλοιώσεις** Lesions Γλώσσα Στόμα Tongue Mouth	ΠΑΙ*** Άκρα 1 2 3 4	GPD ₅₀ Feet
Σειρά Batch	Τύπος Type		Ο Neutralising A	Τίτρε Titre C				
288	A O	5 ml	2.17*	2.40	A	O O	O O O O	Τόσ Α=0.06 ml (Virus) » Ο=0.12 ml
		1	≥2.55	≥2.55		O O O O		
		2	1.72	2.10		X O		
		3	2.17	2.17		X X		
		4	0.90	2.02		X O		
Μ. ὀρος (mean) Μάρτυς (Control)			<0.45	<0.45		X X	X X X X	
289	A O	5 ml	2.47	2.47	O	X X	O O O O	» Α=0.08 ml » Ο=0.20 ml
		6	1.60	2.17		X X		
		7	2.17	2.25		X X X X		
		8	2.00	2.40		X O		
		9	1.72	1.68		X O		
Μ. ὀρος (mean) Μάρτυς (Control)			1.99	2.19		X O	O O O O	
292	A O C	2 ml	<0.45	<0.45		X X	X X X X	» Α=0.48 ml » Ο=0.12 ml » C=0.20 ml
		1	1.95	2.25	≥2.55			
		2	1.65	1.75	1.80			
		3	2.10	2.05	2.17			
		4	2.10	≥2.55	2.40			
		5	1.35	1.57	1.72			
Μ. ὀρος (mean)			2.25	1.80	2.17			
Μ. ὀρος (mean)			1.90	2.00	1.83			

* Log₁₀ του ἀναστρόφου της διαλύσεως του ὄρου (log₁₀ of reciprocal of serum dilution)

** X= ἀλλοιώσεις ΑΠ

(FMD lesions)

O= χωρίς ἀλλοιώσεις

(No lesions)

*** Προστατευτική δόση ινδοχοίρων 50%

(Guineapig Protection dose 50%)

3. Ὁρολογικὸς ἔλεγχος στὰ πρόβατα

Ἐλέγχθηκε τριδύναμο ἐμβόλιο ΑΟC. Ὅπως παρατηροῦμε στὸν πίνακα Π καὶ στὰ πρόβατα ἢ στάθμη τῶν ὀροεξουδετερωτικῶν ἀντισωμάτων εἶναι ἐξ' ἴσου ὑψηλὴ μὲ τὰ βοοειδῆ. Ὁ μέσος ὄρος τῶν τίτλων εἶναι: γιὰ τὸν τύπο Ο = $10^{-1,90}$, γιὰ τὸν τύπο Α = $10^{-2,00}$, γιὰ τὸν τύπο C = $10^{-1,83}$.

ΕΥΖΗΤΗΣΗ

Ἀπὸ τὸ 1964 ἄρχισε στὸ Ἰνστιτοῦτο Ἀφθώδους Πυρετοῦ ἡ χρησιμοποίησις μεθόδου καλλιιεργειῶν κυττάρων ΒΗΚ σὲ μονόστοιβα κυτταροκαλλιιεργήματα περιστρέφομένον φιαλῶν γιὰ παραγωγή ἰοῦ Α.Π. προοριζομένου γιὰ ἀντιαφθωδικὰ ἐμβόλια. Ἡ μέθοδος ὁμως αὐτὴ παρουσιάζει τὸ μειονέκτημα νὰ ἀπαιτεῖ χρόνον, πολὺ προσωπικόν, εἶναι δηλαδὴ δαπανηρὴ καθὼς ἐπίσης καὶ πολὺ κοπιαστικὴ.

Μὲ τὴν ἐγκατάστασις στὸ Ἰνστιτοῦτο ζυμωτῶν ὠφέλιμης χωρητικότητος ἐνὸς τῶν 20 λίτρων καὶ 2 τῶν 100 λίτρων ἀρχίσαμε πειράματα γιὰ τὴν παραγωγή κυττάρων ΒΗΚ αἰωρήσεως καὶ τὴν παραγωγή ἐπ' αὐτῶν ἰοῦ Α.Π. Ἀπὸ τὰ ἀποτελέσματα ποὺ ἀναφέρθησαν παραπάνω προκύπτουν τὰ ἑξῆς:

Μὲ τὴν μέθοδον αὐτὴ τῶν κυτταροκαλλιιεργημάτων αἰωρήσεως, ἐπιτυγχάνονται κυτταροκαλλιιεργήματα 70—80 λίτρων/1 ζυμωτῆ μὲ 1,5 — 3 × 10⁶ κύτταρα/κ.έκ. ἐντὸς 2-3 ἡμερῶν. Μὲ τὰ κύτταρα αὐτὰ μπορεῖ νὰ παρασκευασθεῖ, ἐντὸς ὑλικοῦ Hanks, ἐναιώρημα 100 λίτρων περίπου μὲ 2 — 2,5 × 10⁶ κύτταρα/κ.έκ. γιὰ καλλιιεργεῖα ἰοῦ Α.Π. Ὁ ἰὸς καλλιιεργεῖ ἐντὸς 24 ὥρων περίπου καὶ οἱ παράμετροι ἀντιγονικότητός του εἶναι στὰ ἴδια περίπου ὄρια μὲ ἐκεῖνες τοῦ ἰοῦ ποὺ παράγεται σὲ μονόστοιβα κυτταροκαλλιιεργήματα. Δηλαδὴ τὰ κύτταρα διατηροῦν πλήρως τὴν εὐαισθησίαν τῶν στὸν ἰὸ τοῦ Α.Π.

Οἱ ἔλεγχοι τῶν ἐμβολίων ποὺ παρήχθησαν μὲ ἰὸ καλλιιεργηθέντα σὲ κύτταρα ΒΗΚ αἰωρήσεως ἔδειξαν ὅτι τὰ ὀρολογικὰ δεδομένα καὶ ἡ χορηγομένη ἀνοσία σὲ πειραματόζωα (Ἰνδόχοιροι — βοοειδῆ — πρόβατα), κυμαίνονται ἐπίσης στὰ ἴδια ὄρια μὲ τὸν ἰὸ ποὺ παράγεται ἐπὶ μονόστοιβων κυτταροκαλλιιεργημάτων. Μὲ τὴν μέθοδον καλλιιεργείας κυττάρων ΒΗΚ αἰωρήσεως, οἱ χειρισμοὶ περιορίζονται στὸ ἐλάχιστον, οἱ ἐργασίαι γίνονται στὸν ἴδιον ἠώρον· μὲ τὴν προμήθειαν δὲ ζυμωτῶν μεγαλύτερης χωρητικότητος εἶναι δυνατόν ν' αὐξηθῆ ἡ παραγωγή ἀκόμη περισσότερο. Ἀποφεύγεται ἡ διασπορὰ τοῦ ἰοῦ λόγω τοῦ κλειστοῦ κυκλώματος τῶν ἐργασιῶν, ἡ ποιότητα δὲ τοῦ παραγομένου ἰοῦ Α.Π., μὲ τὴν μέθοδον αὐτὴ, ἐπιτρέπει τὴν παρασκευὴν ἐμβολίων ποὺ χορηγοῦν ἱκανοποιητικὴν ἀνοσίαν. Τὰ μειονεκτήματα τῆς μεθόδου εἶναι, τὸ πρόβλημα τῶν μολύνσεων τῶν κυτταροκαλλιιεργημάτων ἀπὸ μικρόβια, μύκητες κ.λ.π. καὶ ἡ ἐξέυρεσις ἱκανῆς ποσότητος ὀροῦ γιὰ τὴν παρασκευὴν ὑλικῶν καλλιιεργείας κυττάρων, ὅπως τὸ ἴδιον ἄλλωστε ἰσχύει καὶ γιὰ τίς μονόστοιβες κυτταροκαλλιιεργείαι· αὐτὸ συμβαίνει διότι ὁ ἀριθμὸς τῶν σφαζομένων μόσχων στὰ σφαγεῖα τῆς περιοχῆς μας, ἀπ' ὅπου προμηθευόμαστε τὸν ὀρό, εἶναι περιορισμένος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την εφαρμογή της μεθόδου καλλιέργειας κυττάρων ΒΗΚ αίωρήσεως σε ζυμωτές τών 100 λίτρων, επιτυγχάνονται εντός 48-72 ωρών κυτταροκαλλιέργηματα $1,5 - 3 \times 10^6$ κυττάρων/κ.έκ. Τα κύτταρα διατηρούν την ευσταθσία τους στα έμβολιαστικά στελέχη ιού Ο₁ Α Πλατύ και C₁ Detmold, οι παράμετροι αντίγονικότητας του ιού πού παράγεται σε τέτοια κύτταρα είναι ικανοποιητικές και παρασκευάζονται έξ' αυτού έμβόλια πού παρέχουν ικανοποιητική άνοσία στα βοοειδή και πρόβατα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mac Pherson I.A. and Stoker M.G.P.: *Virology* 1962, 96, 147-151.
2. Mowat G.N. and Chapman W.G.: *Nature* 1962, 194, 253-255.
3. Polatnick J. and Bachrach H.L.: *Appl. Microb.* 1964, 12, 4, 368-373
4. Ubertini B. Nardelli L. Dal Prato A., Panina G., Barei S.: *Zbl vet med* 1967, 14, 432-441.
5. Capstick P.B., Telling R.C., Chapman W.G., Stewart D.L.: *Nature* 1962, 195, 4847, 1163-1164.
6. Telling R.C. and Elsworth R.: *Biotechnology and Bioengineering* 1965, 7 414-434.
7. Pappous C., Zordoumis C., *Bull. off. Int. Epiz.* 1975, 83, (1-2) 71-80.
8. Χ. Παππού, Δ. Μπρόβα, Π. Στουραίτη, Ι. Καραβαλάκη και Ι. Καρδάση.: *Δελτ. Έλλην. Κτην. Έταιρ.* 1967, 21, 1, 1-13.