

کشت سلول و اهمیت آن در ویروس شناسی امروزه

رده‌های سلولی موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی

دکتر خسرو فرهی* دکتر فخر السادات محمدزاده کیائی**

استفاده، فقدان جانور حساس به برخی از ویروسها، مشکلات انجام آزمایشات در روی حیوانات و بالاخره متغیر بودن درجه حساسیت افراد یک‌گونه، از مسائلی بودند که جداً از پیشرفت ویروئولوژی سماعت و تحقیق و بررسی را در این زمینه بینهایت مشکل و پرخارج می‌ساختند. از اینرو تحقیقات ویروس‌شناسی فقط در انحصار آزمایشگاه هائی بود که امکانات اقتصادی بسیار زیادی داشتند.

بنظر می‌رسد که ذکر مثال زیر برای نشان دادن مشکلات کارت تحقیقات ویروئولوژیکی در عهدیکه از جانور بعنوان محیط کشت استفاده میشد مناسب باشد:

تحقیقات مربوط به نشان دادن اینکه ویروس فلج اطفال سه تیپ آنتی ژنیک دارد در روی سیمون انجام گرفت، برای این کار چند گروه از کارشناسان تحت سرپرستی مؤسسه ملی مبارزه با فلج اطفال آمریکا بمدت دو سال در چهار دانشگاه بزرگ ایالات متحده کار و کوشش کردند و متجاوز از بیست هزار سیمون مورد استفاده قرار گرفت تا اینکه تعداد سروتیپ‌های ویروس پولیویبیلیت بطور یقین شناخته شد. کاری که سابقاً اینهمه مشکل و پرخارج بود در سایه استفاده از کشت سلول امروزه بقدری ساده و آسان شده است که براحتی در عرض دوسه روز در تمام آزمایشگاههای ویروئولوژی انجام میگردد.

برای تعدادی از ویروسها جانور حساس وجود ندارد لذا تا زمانیکه از دامهای زنده و جنین جوجه برای کشت و مطالعه ویروسها استفاده میشد بوجود آنها پی برده نشد. تعداد این ویروسها امروزه متجاوز از صد میباشد که استفاده از کشت سلول سبب شناسائی و مطالعه آنها گردیده است. موارد کار برد کشت سلول در ویروس‌شناسی بقرار زیر است:

در جریان ۱۵ سال اخیر علم ویروس شناسی برق آسا پیش‌تاخته و رقم ویروسهای شناخته شده بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. این علم نه تنها به ذات خود شتابان پیش می‌رود بلکه سیر تکاملی ویروئولوژی ویرال پرده‌ها از راز زندگی می‌چیند و بشر را قدم به قدم به خاستگاه حیات نزدیکتر می‌سازد.

مطالعه خواص ویروئولوژیکی اسیدهای هسته‌ای خالص و متبلور که از ویروسها جدا شده بود در زیست‌شناسی انقلاب بوجود آورد و مفهوم کلیه زندگی را یکباره دگرگون ساخت، قسمت‌سهمی از تحقیقات و بررسیهای مربوط به مسائل حیاتی از موجود زنده به سلکول منتقل گردید و رشته جدیدی بنام ویروئولوژی سلکولی بنیان گرفت.

ویروس شناسی در اواخر قرن نوزدهم بوجود آمد و لسی تا نیمه‌های قرن بیستم پیشرفت آن بسیار کند و بطئی بود. درین عواملی که سبب پیشرفت سریع ویروئولوژی گشته و موجبات گسترش جهانی آنرا فراهم ساخته است در درجه اول باید از تکمیل شدن تکنیک‌های کشت سلول و استفاده از آن در ویروس‌شناسی یاد کرد. روش‌های جدید کشت سلول راه را برای جهش ویروئولوژی باز نمود و بمطالعات و تحقیقات با ارزش بیشماری امکان داد. بطوریکه میدانیم ویروسها جز در داخل سلولهای زنده قادر به تکثیر نمیشوند لذا از اواخر قرن نوزدهم تا سال ۱۹۳۱ برای کشت و مطالعه ویروسها منحصرماً از جانوران زنده و از این تاریخ تا نیمه‌های قرن بیستم از تخم مرغ جنین دار و دامها توأمآ استفاده میشد. در بین جانوران هم بیشتر اوقات سیمون مورد استفاده قرار میگرفت و لسی قیمت نسبتاً گران سیمون و سایر دامها، هزینه گزاف نگهداری و پذیرائی از آنها، وجود ویروسهای نهفته در بدن جانوران مورد

* دپارتمان میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی

در آغاز کار برای زنده نگهداشتن و پرورش قطعات نسج در خارج از بدن آنها را در محیط‌های مغذی طبیعی نظیر لاف، پلاسما و عصاره جنین پستانداران یا جنین جوجه کشت میدادند ولی بموازات تکامل روشهای کشت بافت، احتیاجات غذائستی و متابولیکی بافتهای کشت داده شده با دقت مورد بررسی قرار گرفت و محیط‌های کاملاً مصنوعی و یانیمه مصنوعی نیز برای کشت آنها ساخته شد. آماده شدن محیط‌های مغذی مناسب برای کشت نسج و کشف آنتی‌بیوتیک‌ها راه را برای رسیدن به کشت سلول هموار ساخت. با علم باین موضوع که ویروسها جز در بطن سلولهای زنده قادر بتکثیر نمیشاند، ویرولوژیست‌ها خیلی زود توجه خود را به کشت بافت معطوف نمودند:

اشتین هارد (Steinhardt) برای نخستین بار در سال ۱۹۱۳ [۲۵] امکان تکثیر ویروس واکسن را در کشت قرنیسه خرگوش نشان داد. تا سال ۱۹۴۵ دیگر در این مورد تحقیقی انجام نگرفت. از این تاریخ ببعد مجدداً فعالیت برای نشان دادن تکثیر ویروسها در کشت بافت آغاز گردید و کارشناسانی نظیر پارکر و همکاران [۲۱]، کارل [۴-۳]، مایتلند و همسرش [۱۵] و بالاخره آندرس (۹) در این خصوص به تحقیق و بررسی پرداختند و بتایچ بسیار سهم و با ارزش دست یافتند. گرچه بررسیهای پژوهندگان ناسبرده امکان تکثیر ویروسها را در کشت بافت مسلم ساخت ولی چون مشکلات زیادی برای نشان دادن شواهد تکثیر ویروس بر روی قطعات نسج وجود داشت لذا استفاده از کشت بافت برای کشت و مطالعه ویروسها جنبه عملی زیادی پیدا نکرد و برای پیشرفت این رشته آنطوریکه تصور میرفت مفید واقع نگردید.

همانطوریکه قبلاً نیز نگاشته شد ویروس شناسی ترقی و پیشرفت سریع خود را به کشت سلول مدیون است که از سال ۱۹۵۲ ببعد متداول و برای کشت و مطالعه ویروسها مورد استفاده قرار گرفت [۵]. ارزش و اهمیت فوق‌العاده کشت سلول برای ویروس شناسی و مزیت و برتری آن بر کشت بافت در این است که اغلب ویروسها ضمن تکثیر در کشت سلول باعث استحاله یاخته‌ها میگردند و یا آسیب‌هایی ایجاد میکنند که مستقیماً در زیر میکروسکپ‌های معمولی بوضوح قابل رؤیت است و دلالت بر وجود ویروس و تکثیر آن مینماید. در مواردی که تکثیر ویروس در کشت سلول بدون ایجاد آسیب‌های قابل رؤیت انجام میگردد، میتوان با استفاده از روشهای تولید پلاک، انترفرانس، همداسورپسیون و ایمونوفلورسنت-سانس بوجود آن پی برد.

انواع کشت سلول

تهیه کشت سلول به مقدار زیاد باسانی امکان پذیر میباشد.

هویت و تیراسیون آنتی‌کوره‌های ویرال، تهیه آنتی‌ژنهای ویروسی برای ثبوت مکمل و یا بمنظور تلقیح بجانوران جهت بدست آوردن ایمونوسرمهای رفرانس، تهیه واکسن برای برخی از امراض ویروسی انسان و جانوران، بررسی تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیائی بروی ویروسها و یا دخالت آنها در انتراکسیون ویروس - سلول، انجام تحقیقات بی‌شمار در مورد بیولوژی ویرال از قبیل کیفیت تکثیر ویروسها در داخل سلولها، نقش اسیدهای هسته‌ای در چگونگی فعالیت‌های عفونی ویروسها، بالاخره مکانیسم تغییرات متابولیسم و پیدایش نئوآنتی‌ژنها و انترفرون در سلولهاییکه سیزبان ویروس میباشند.

در حال حاضر غیر از ویروس شناسی رشته‌های دیگری نظیر باکتریولوژی، پارازیتولوژی، ایمونولوژی، سیتولوژی، بیولوژی و بیولوژی مولکولی، فارماکولوژی، و کانسرولوژی نیز در کارهای تحقیقاتی خود از کشت بافت و کشت سلول استفاده مینمایند و زمینه استعمال آنها روز بروز گسترش مییابد. هم‌اکنون که از کشت بافت سخن بمیان آمد لازم است متذکر شویم که از سال ۱۸۸۴ تا ۱۹۵۲ تحقیقات و مطالعاتی برای زنده و در حال رشد نگهداشتن قطعات کوچک بافتهای مختلف در خارج از بدن جانوران صورت میگرفت لذا از این فعالیتها تحت عنوان کشت بافت نامی بریم. کشت سلول از سال ۱۹۵۲ ببعد متداول گردیده است. نباید تصور نمود که پیشرفتهای حاصله در زمینه کشت بافت و کشت سلول بخاطر ویروس شناسی بوده است، حقیقت اینست که فعالیت‌های مربوط به کشت بافت‌های جانوران قبل از پیدایش علم ویروس شناسی آغاز گردیده است. در بین تحقیقاتی که از سال ۱۸۸۴ تا ۱۹۰۶ در زمینه نسج انجام گرفته از همه مهمتر کارهای روس-گرانویل هاریسون [۱۱] میباشد که در تمام دنیا بعنوان پایه و شالوده حقیقی کشت بافت شناخته شده است. در سال ۱۹۱۲ کارل (Carrel) [۲] با استفاده از روشهای هاریسون و کشف این موضوع که عصاره جنین مرغ و پستانداران اثر اعجاز‌آمیزی در رشد بافت‌های کشت شده دارد موفق گردید نسوجی را ساله‌ادر خارج از بدن زنده و در حال رشد نگهدارد. در آن زمان که هنوز آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته نشده بودند یکی از مشکلات مهم کارشناسان آلودگیهای میکروبی و قارچی بود که اکثراً در کشت‌های بافت‌بروز میکرد و زحمات را بهدر میداد، باوجود این دقت و ظرافت کارهای کارل بحدی بود که توانست قطعه‌ای از بافت جنین جوجه را بمدت ۳۲ سال در خارج از بدن زنده و در حال رشد نگهدارد. بتدریج کارشناسان زیادی دنبال کار کشت بافت را گرفتند و آن را بتکامل بردند.

اروزه در آزمایشگاههای ویروس‌شناسی از دو نوع کشت سلول استفاده میشود که عبارتند از کشتهای نخستین سلول (Cultures Primaires) ورده‌های سلولی (Cultures en lignées Continues) چون جزئیات روشهای کشت سلول از بافت‌های مختلف جانوران در کتب [۲۳-۱۴] بتفصیل تشریح گردیده است لذا در اینجا بتوضیح مختصر اکتفا میشود.

۱- کشت‌های نخستین سلول

بافتی را که کشت سلولهای آن مورد نظر است در شرایط آسپسی کامل از بدن انسان یا جانوران برمی‌دارند و آن را بکمک قیچی استریل به قطعات ۱-۲ میلی متری تقسیم مینمایند، قطعات نسج را چند بار با یک محلول نمکی ایزوتونیک معادل نظیر محلول هنکس، ارل ویا P.B.S (Phosphate-buffered saline) می‌شویند تا خون موجود زایل شود، آنگاه تکه‌های بافت را در محلول ۲ در هزار تریپسین در P.B.S. که فاقد یونهای کلسیم و منیزیم باشد می‌ریزند (باتوجه به نوع بافت ممکن است بجای تریپسین از ورسن، کلاژناز ویا پروناز استفاده شود) مخلوط تریپسین و قطعات نسج را در حرارت ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد بکمک بهم‌زن مغناطیسی بهم می‌زنند. باین ترتیب پلهائیکه سلولها را بهم وصل میکند هضم میشوند و سلولها بطور منفرد ویا توده‌های کوچک بتدریج در محلول تریپسین آزاد میگردند. نیمساعت به نیمساعت تریپسین را که سلولهای آزاد شده، در آن بحال تعلیق هستند برداشته در یخچال ۴ درجه قرار میدهند و بروی تکه‌های هضم نشده دوباره تریپسین تازه میریزند و مخلوط را تکان میدهند. این کار را آتقدر ادامه میدهند تا تقریباً همه یا قسمت اعظم سلولهای متشکله بافت از هم جدا گردند. یوسيله سانتریفوگاسیون سلولها را از محلول تریپسین جدا و پس از دوبار شستشو با محلول هنکس یا ارل آنها را در محیط غذایی مناسب معلق میسازند. اگر این سوپانسیون را در شیشه‌های کتابی بریزند و در گرمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهند یاخته‌ها به سطح جداری از شیشه که با مایع در تماس است می‌چسبند و شروع به تکثیر مینمایند بطوریکه در عرض چند روز تمام سطح مزبور از یک ورقه سلولی تک‌لایه پوشیده میشود، در این مرحله اگر مایع غذایی کشت سلول را دور بریزند و بروی ورقه سلولی که بجدار شیشه چسبیده است محلول تریپسین اضافه کنند پس از چند دقیقه ورقه سلولی از جدار شیشه کنده میشود و سلولهای متشکله آن متفرق میشوند. سلولها را از تریپسین جدا میکنند و پس از شستشو و تعلیق در محیط مغذی، محصول یک شیشه را در دو یا سه شیشه دیگر که بانداژه شیشه اولی هستند وارد میسازند. این عمل را پاساژ یا ریکالژی میگویند.

اغلب کشت‌های سلولی که بطریق بالا از هضم آنزیمی بافتهای جانوری بدست میآیند پس از چند پاساژ قدرت تکثیر خود را از دست داده و از بین میروند. این کشتها را کشتهای نخستین سلول میگویند. کشت‌های نخستین سلول در مرحله اولیه زندگی In-Vitro خود مورد استفاده قرار میگیرند و ازین میروند. برای تهیه مجدد آنها الزاماً از سلولهای بافت تازه که از جانور زنده گرفته میشوند استفاده میکنند.

۲- کشت‌های سلولی رده پیوسته

اگر کشت‌های سلولی را در شرایط مخصوص و در محیط های غذایی بسیار غنی پاساژ دهند گاهی اتفاق میافتد که تعدادی از سلولهای یک کشت که قدرت آداپتاسیون آنها زیاد است بزندگی (In-Vitro) عادت میکنند و در صورت پاساژهای مرتب و بموقع سالهای سال بزندگی و تکثیر خود ادامه میدهند. کشت‌هایی از این قبیل را کشتهای سلولی رده پیوسته میگویند (که ترجمه‌ای است از Lignée Cellulaire). منشاء رده های سلولی ممکن است از بافت‌های سرطانی و یا از نسوج سالم باشد با این تفاوت که اگر سلولهای سرطانی در خارج از بدن کشت و پاساژ داده شوند خیلی آسان‌تر از سلولهای بافت سالم بزندگی In-Vitro آداپته میشوند و بصورت سلولهای رده پیوسته درمیآیند. سلولهای سالم مادامیکه بر اثر کشتهای متوالی سلولهای بدخیم تبدیل نگردند نمیتوانند رده سلولی بوجود بیاورند. بعبارت دیگر در جریان پاساژهای مکرر آداپته شدن سلول های بافت سالم بزندگی در خارج از بدن و تبدیل آنها به سلولهای رده پیوسته بر اثر ترانسفورماسیون سلولها صورت میگیرد. اگر سلولهای رده پیوسته را که از بافت سالم بدست آمده است به حیوان دیگری از همین گونه پیوند کنند در محل پیوند تومور بدخیم ظاهر میگردد [۸].

چون تمام رده های سلولی هتروپلوئید هستند لذا چنین بنظر میرسد که بوجود آمدن سلولهای رده پیوسته مستلزم پیدایش این وضع کروموزومی باشد.

اولین رده سلولی در سال ۱۹۵۲ توسط Gey [۱۰] از یک کارسینوم گردن رحم بدست آمده ورده سلولی هلا (Hela) نام دارد و در اغلب آزمایشگاههای ویروس شناسی نگهداری شده و مورد استفاده قرار میگیرد. تعداد تیره‌های سلولی روز بروز افزایش مییابد و اهمیت آنها برای آزمایشگاههای ویروس شناسی فوق‌العاده زیاد است. از تیره‌های سلولی در زمینه‌هایی که قبلاً تحت عنوان موارد کاربرد کشت سلول ذکر گردیده است استفاده میشود، با این تفاوت که در روی رده‌های سلولی نمیتوان برای انسان واکسن

آن مخصوصاً نسبت به آنزو ویروسها بیشتر از سلولهای هلا و KB گزارش شده است [۱۹].

۵- رده سلولی RK₁₃ (Rabbit Kidney) در سال ۱۹۶۳ توسط Beale [۱] از سلولهای کلیه بچه خرگوش بدست آمده است و برای مطالعه ویروس روبول و پاکس ویروسها مناسب میباشد [۲۰].

۶- رده سلولی Vero در سال ۱۹۶۳ از سلولهای کلیه سیمونهای سبز آفریقائی بدست آمده [۲۶] و خواص بیولوژیکی و حساسیت این تیره سلولی نسبت به ویروسهای مختلف اخیراً مورد مطالعه دقیق قرار گرفته است [۲۲].

مبدأ و تاریخ وصول رده های سلولی ناسبرده در جدول

زیر خلاصه شده است :

مبدأ و تاریخ وصول رده های سلولی

نام رده سلولی	مبدأ	تاریخ وصول
Hela	انستیتو رازی (حصارک)	۱۳۴۵/ ۲/۲۲
KB	انستیتو میکروبیولوژی لوزان (سویس)	۱۳۴۵/ ۳/۱۵
Am ₂₇	آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده بهداشت (تهران)	۱۳۴۷/۱۰/۱۶
HeP ₂	آزمایشگاه فرانس ویروس (لندن)	۱۳۴۸/ ۶/۲۵
Vero	» » » »	۱۳۴۸/ ۶/۲۵
RK ₁₃	» » » »	۱۳۴۸/ ۶/۲۵

همه رده های سلولی ناسبرده در محیطی که منبع اسیدهای آمینه آن هیدرولیزای کازئین میباشد [۱۳] و در خود آزمایشگاه تهیه میگردد کشت و نگهداری میشوند.

خلاصه

علم ویروس شناسی پیشرفت سریع خود را به کشت سلول مدیون است که از سال ۱۹۵۲ بپسند متداول شده است. بدون اغراق میتوان گفت که استفاده از کشت سلول تحولی شگرف و انقلابی پرنرم در ویرو لژی بوجود آورد. کشت سلول نه تنها به تهیه واکسن برضد تعدادی از بیماریهای ویروسی انسان و جانوران تحقیق بخشید بلکه شناسائی ویروسهای جدیدی را نیز سبب گردید و به کشفیات با ارزش بیشماری اسکان داد. در ویروس شناسی امروزه دو نوع کشت سلول مورد استفاده قرار میگیرد که عبارتند از کشتهای نخستین سلول و کشتهای رده پیوسته.

های ضد بیماریهای ویروسی تهیه نمود در صورتیکه انجام این کار در مواردی برای داسها بلا مانع میباشد. چون نگهداری و پاساژ رده های سلولی نسبتاً آسان بوده و مستلزم مخارج گزاف نیز نمیشد لذا این قبیل کشتهای سلولی برای آزمایشگاههای کوچکی که امکانات فنی و اقتصادی زیادی ندارند خدمت بزرگی انجام میدهند.

کشت های نخستین سلول ممکن است با ویروسهای بدن جانور بافت دهنده آلوده باشد و اشتباهات و خطاهای زیادی را در تفسیر نتایج آزمایش ها و تحقیقات سبب گردد، در صورتیکه این مسئله در مورد کشتهای رده پیوسته مطرح نیست. از سزایای دیگری که میتوان در مورد رده های سلولی یاد آورش این است که حساسیت برخی از آنها برای تعدادی از ویروسها خیلی بیشتر از کشتهای نخستین سلول میباشد [۱۲].

رده های سلولی موجود در بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی: چون ممکن است اکثر همکاران ارجمند ما در تهران یا شهرستانها برای کارهای روزانه آزمایشگاهی و یا فعالیتهای تحقیقاتی و تعلیماتی خود به برخی از رده های سلولی که در اختیار ندارند، نیاز پیدا کنند، لذا جناب آقای دکتر شفا مدیر محترم گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی یاد آورشند که در این فرصت رده های سلولی موجود در بخش میکروبیولوژی با اطلاع برسد تا چنانچه مورد حاجت همکاران گرامی باشد در اختیار آنان قرار داده شود.

هم اکنون در بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران شش نوع رده سلولی دائماً پاساژ و نگهداری میشوند که عبارتند از: رده های Am₅₇، Vero، HeP₂، KB، HeLa و RK₁₃.

۱- رده سلولی هلا HeLa در سال ۱۹۵۲ توسط Gey [۱۰] از یک کارسینوم گردن رحم جدا گردیده و از شناخته شده ترین و پرمصرف ترین تیره های سلولی دنیا میباشد. سلولهای هلا بتعداد زیادی از ویروسهای جانوری حساس است [۱۷].

۲- رده سلولی KB در سال ۱۹۵۴ توسط ایگل Eagle [۶] از کارسینوم دهان بدست آمده و حساسیت آن نسبت به ویروسها تقریباً نظیر سلول هلا میباشد [۷]. ولی مقاومتش در مقابل تغییرات شرایط زیستی بیشتر از سلول هلا است.

۳- رده سلولی HeP₂ در سال ۱۹۵۵ توسط مور (Moore) و همکارانش [۱۸] از یک کارسینوم لارنکس جدا شده است و از نظر حساسیت به ویروسها در ردیف رده های هلا Hela و KB قرار دارد.

۴- رده سلولی آسینوس ۵۷ (Amnios 57) که آنرا رده سلولی Am₅₇ نیز میگویند در سال ۱۹۵۸ توسط Mayer [۱۶] از سلولهای غشاء آسینون جفت انسان بدست آمده است و حساسیت

در حال حاضر شش رده سلولی در آزمایشگاه میکروویولوژی میگیرند که عبارتند از رده های سلولی
 دانشگاه پزشکی دانشگاه تهران نگهداری و مورد استفاده قرار
 RK₁₃ 'Vero' Am₅₇ 'HeP₂' 'KB' 'HeLa

Bibliographic

- 1- Beale(A.J.), Christofinis(G.C.) - Lancet, 1963, 21, 640
- 2- Carrel (A.) - J. Exper. Med., 1912, 15, 516
- 3- Carrel(A.) - J. Exper. Med., 1913, 17, 14
- 4- Carrel (A.) and Ebling (A.H.) - J. Exper. Med., 1926, 43, 461
- 5- Dulbecco(R.) and Vogt(M.) -J. Exper. Med., 1954, 99, 167
- 6- Eagle(H.) - Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1955, 89, 362
- 7- Eagle (H.), Habel (K.) and coll. -Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1956, 91, 361
- 8- Earle (W.R.) - Nat. Cancer Inst., 1943, 4, 165
- 9- Enders (J.F.), Weller (T.H.) and Robins (F.C.) - Science, 1949, 109, 85
- 10- Gey (G.O.), Coffman (W.O.) and Kibucek (M.I.) - Cancer Res., 1952, 12, 264
- 11- Harisson (R.) - Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1907, 4, 140
- 12- Kawana (R.) and Matsumoto(I.) - Jap. J. Microbiol., 1969, 13, 79
- 13- Lépine (P.), Slizewcz (P.) et coll.-Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 654
- 14- Lépine (P.) Techniques de laboratoire en virologie humaine, 1964, Masson Edit.
- 15- Maitland (H.B.) and Maitland (M.C.) - Lancet, 1928, 215, 569
- 16- Mayer (V.), Mayerova (A.) and Vilcer (J.) - Acta. Virologica., 1959, 3(suppl), 51
- 17- Melnick (J.L.), Ramos-Alvarez (M.)- Yale J. Biol. and Med., 1954, 26, 462
- 18- Moore (A.) - Cancer Res., 1955, 598
- 19- Nategh (R.), Gaudin (O.G.) et coll.- Ann. Inst. Pasteur, 1969, 116, 121
- 20- Netter (R.) et Piata (A.) - Ann. Inst. Pasteur, 1969, 116, 820
- 21- Parker (F.J.) and Ney(R.N.) - Amer. J. Path., 1925, 1, 325
- 22- Rhim (J.S.) - Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1969, 132, 670
- 23- Sohier (R.) - Diagnostic des maladies à virus, 1964, Flammarion Edit.
- 24- Stanley (W.M.) - Science, 1935, 81, 644
- 25- Steinhardt (E.) and Israeli (C.) - J. Infect. Dis., 1913, 13, 294
- 26- Yasumara (Y.) and Cawatica (N.) - Nihon Rinsho, 1963, 21, 1201