

مقایسه دو روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و ثبوت مکمل
برای جستجو و تعیین عیار آنتی بادی در عفونت‌های
سیتومگالوویروسی (CMV)

دکتر فخرالسادات محمدزاده کیانی

خلاصه

نظر باینکه برنامه‌ای برای مطالعه چگونه انتشار سیتومگالوویروسها در ایران تهیه گردیده است و تحقیق در این مورد باروشهای سرولوژیکی انجام خواهد گرفت بنابراین لازم بود روش سرولوژیکی حساسی که با امکانات فنی ما وفق دهد بررسی و انتخاب گردد.

باین منظور با دو روش ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در سرم ۷۲ نفر از دهنندگان خون (Blood donors) و ۱۶ نمونه سرمی که از نوزادان مشکوک به عفونت سیتومگالوویروسی و مادرانشان بدست آمده بود به جستجو و تعیین عیار آنتی بادی سیتومگالوویروس مبادرت گردید. در این مقاله مختصری از اهمیت سیتومگالوویروسها در پاتولوژی انسانی، نتایج حاصل از مقایسه حساسیت دو تست ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و همچنین روش مناسب برای تهیه و تیتراسیون آنتی‌ژن سیتومگالوویروسی از نظر میگذرد.

مقدمه

سیتومگالوویروسها یا CMV از نظر کلاسیفیکاسیون جزو ویروسهای گروه تبخال‌زا (Herpesviruses) هستند و با ویروسهای

هرپس سیمپلکس، آبله‌مرغان - زناو (Epstein-Barr) EB هم‌خانواده میباشند. انسان و گونه‌های مختلف جانوری دارای سیتومگالوویروسهای مخصوص بخود هستند. از سیتومگالوویروسهای انسانی تاکنون سه نوع آنتی ژنیکی شناخته شده است (۱۸) که جز در بدن انسان و یا در کشت سلولهای فیروبلستی انسان، در سلولهای هیچکدام از جانوران دیگر تکثیر حاصل نمیکند. سلولهای آلوده با سیتومگالوویروس متورم میشوند بطوریکه بر اثر افزایش حجم اندازه آنها تا چهل میکرون هم میرسد و در داخل هسته آنها انکلوژیونهای اسیدوفیل درشتی در حدود ۱۵ میکرون بوجود میآید. سلولهایی با این مشخصات در غدد بزاقی ۱۰ تا ۲۰ درصد از کودکان سالم کمتر از ۵ سال که بر اثر تصادفات و حوادث در گذشته‌اند دیده شده است و نمایانگر انتشار وسیع سیتومگالوویروسها در اجتماعات انسانی میباشد. کودکان آلوده ماهها، حتی سالها ویروس را در بزاق و ادرار خود دفع مینمایند. (۵ - ۸ - ۱۳) دفع ویروس بالاخره پس از گذشت مدتی قطع میگردد در صورتیکه ممکن است خود ویروس حتی تا آخر عمر بحال کمون در داخل سلولها باقی بماند. هرچه عفونت در سنین بالا رخ بدهد مدت زمان دفع ویروسی کوتاهتر است. گرچه سیتومگالوویروسها بشدت انتشار دارند مع الوصف تا

سال ۱۹۵۶ بوجود آنها پی برده نشد تکمیل شدن روشهای کشت سلولی و استفاده از آن برای کشت ویروسها سبب شناسایی سیتومگالوویروسها گردید (۱۲ - ۱۴ - ۱۷) و مطالعات بعدی اهمیت فوق العاده آنها را در پاتولوژی انسانی مخصوصا در پاتولوژی جنین و نوزادان مشخص نمود و ثابت گردید که عامل یک درصد از مرگ و میرهای نوزادان و مسئول اکثر میکروسفالیها همین ویروسها هستند. در پیش بانوان اگر عفونت در دوران حاملگی اتفاق بیافتد و یا بر اثر عفونت پیشین هنوز هم دافع ویروس مانده باشد، جنین در داخل رحم و یا بهنگام تولد با ویروس آلوده میشود و نوزاد به بیماری انکلوژیون سیتومگالیک مبتلا میگردد. هپاتواسپلنومگالی توأم با یرقان، پورپوری ترمبوسیتوپنیک و آنمی همولیتیک از علائم بارز عفونت نوزادان بوسیله CMV میباشد (۴) که اغلب در چند روز یا چند هفته پس از تولد سبب مرگ نوزاد میشود. نوزادان آلوده هم که تلف نمیشوند در پیش آنها یادگارهای عفونت بصورت ضعف قوای دماغی، عقب ماندگی فکری و میکروسفالی ظاهر میگردد (۹). یکی دیگر از عوارض شایع عفونتهای سیتومگالوویروسی نوزادان کوربورتینیت است که اغلب باعث اشتباه عفونتهای سیتومگالوویروسی باتوکسوپلاسموز کونژنیتال میشود (۱۹). با وجود این طی سالهای اخیر گزارشاتی از عفونتهای داخل رحمی با سیتومگالوویروسها که عارضه قابل توجهی در نوزاد ایجاد نکرده باشد منتشر گردیده است.

عفونت سیتومگالوویروسی کودکان در اکثر موارد بدون علامت کلینیکی است ولی حالت مزمن پیدا میکند و شخص مدتهای مدید حامل (Carrier) و دافع ویروس باقی میماند، گاهی هم ممکن است هپاتیت یا پنومونیت ایجاد نماید. در پیش کودکان و افراد بالغ که بهلت پیوند کلیه، لوسمی و یا سرطان بسمدت طولانی با مواد ایمنوسوپرسیو تحت درمان قرار میگیرند، سیتومگالوویروس که در بدن بحال نهفته و غیرفعال وجود دارد حالت حمله بخود میگیرد.

عامل مولد منونوکلئوزهای بعد از انتقال خون هم سیتومگالوویروس میباشد که اغلب در گیرندگان مکرر خون بروز میکند و با تب و افزایش تعداد منونوکلترهای غیرطبیعی همراه است (۶).

مطالبی که درباره پاتوژنز و مشخصات بیولوژیکی سیتومگالوویروسهای انسانی گفته شد ارزش و اهمیت فوق العاده تشخیص آزمایشگاهی عفونتهای سیتومگالوویروسها را از نظر اپیدمیولوژی و کلینیک بخوبی آشکار میسازد. برای این منظور از

دو روش مستقیم و غیرمستقیم استفاده میشود. روش مستقیم متکی به جدا کردن ویروس از بزاق، ادرار، بیوپسی کبد، لکوسیتها (در مورد منونوکلئوزهای بعد از انتقال خون) و بالاخره قطعات اتوپسی است. در این روش، بزاق، ادرار و یا عصاره نسوج به کشت سلولهای فیروپلاستی انسان که تنها سیستم سلولی حساس میباشد تلقیح میگردد. تکثیر ویروس در کشت سلول بکندی صورت میگیرد و بدست آوردن نتیجه قطعی سه تا شش هفته بطول می انجامد ضمنا نباید از نظر دور داشت که در مواردی با وجود حضور ویروس در برداشتها، اقدام به جدا کردن ویروس به نتیجه مثبت منتهی نمیگردد. مطلب مهم دیگر اینکه جدا کردن ویروس از افرادی که حامل ویروس هستند ولی دافع آن نمیشاند بسادگی مقدور نیست، بنابراین معمولا سعی میشود تشخیص آزمایشگاهی عفونتهای سیتومگالوویروسی بکمک روشهای سرولوژیکی (غیرمستقیم) صورت گیرد و در صورت امکان نتیجه بکمک آزمایش مستقیم تأیید گردد ضمنا در مطالعات اپیدمیولوژیکی، تنها روشهای سرولوژیکی قابل اجرا است.

چهار روش سرولوژیکی بطور متداول برای جستجو و تعیین عباراتی بادی سیتومگالوویروسی مورد استفاده قرار میگیرند که عبارتند از سرونوترالیزاسیون (۱۰) رادیوایمونواسی (۱۱) (Radioimmunoassay) ثبوت مکمل (۱۵) و بالاخره هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (۲). چون روش سرونوترالیزاسیون در روی کشت سلول انجام میگیرد بنابراین، در نتیجه مواجهه بودن به کندی تکثیر ویروس، برای آزمایش نمونههای سرمی که تعداد آنها زیاد باشد قابل اجرا نیست. روش رادیوایمونواسی بسیار حساس است ولی مستلزم تجهیزات بسیار گرانی است که تهیه اش بسادگی مقدور نمیشاند ولی روشهای ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم را برای جستجو و تعیین عباراتی بادی CMV در هر آزمایشگاهی بسهولت میتوان پیاده نمود.

نظر باینکه برنامه ای برای مطالعه چگونگی انتشار سیتومگالوویروسها در ایران تهیه گردیده است و تحقیق در این مورد منحصر با روشهای سرولوژیکی امکان پذیر است بنابراین دو روش ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از نظر حساسیت با هم مقایسه گردید تا روش حساس تر در مطالعه سرواپیدمیولوژیکی CMV ما مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

تهیه آنتی ژن - آنتی ژن استاندارد سیتومگالوویروس از سویه AD-۱۶۹ ویروس تهیه گردید و این آنتی ژن در هر دو تست

اسید تانیک بحجم مساوی با هم مخلوط شد و بمدت ده دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بوسیله سانتریفوژ کردن (۱۵۰۰ دور در دقیقه) گلبولها از اسید تانیک جدا کردید و یکبار با PBS شسته شد و مجدداً از آن سوسپانسیون ۲/۵ درصد در PBS، PH=۶/۴ ساخته شد و حداکثر تا ۴ ساعت بعد از تهیه بکار برده شد.

جذب آنتی‌ژن بروی گلبولهای قرمز (حساس‌نمودن گلبولهای قرمز) - چهار حجم از PBS، PH=۶/۴ با یک حجم از رقت ۸ آنتی‌ژن و یک حجم از سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز گوسفند که با اسید تانیک عمل شده بود با هم مخلوط گردید و مدت نیمساعت در حرارت اطاق بحال خود گذاشته شد. گلبولهای قرمز بوسیله سانتریفوژ کردن (۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰) از مایع جدا گردید، دو بار با محلول رقیق‌کننده شسته شد و از آن در همان محلول رقیق‌کننده سوسپانسیون ۰/۵ درصد تهیه شد.

آماده‌نمودن نمونه‌های سرمی - تمام نمونه‌های سرمی پس از ده بار رقیق شدن بوسیله مایع رقیق‌کننده، بمنظور از بین بردن کمپلمان (ایناکتیواسیون) مدت نیمساعت در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بازاء هر CC از سرم دکمپلمانه ۰/۱ CC سوسپانسیون ۵۰ درصد گلبول قرمز گوسفند بآن اضافه گردید و مدت نیمساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا چنانچه در نمونه‌های سرمی، برای گلبولهای قرمز آگلوتینین وجود داشته باشد جذب گردد. سرماها بوسیله سانتریفوگاسیون از گلبول قرمز جدا گردید و باین ترتیب برای آزمایش (جستجو و تعیین عیار CMV آنتی‌بادی) آماده گردید.

روش انجام تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

با استفاده از میکروسیستم تاکاتسی ۰/۰۵ از هر نمونه سرمی که در جریان ایناکتیواسیون ده بار رقیق شده بود رقتهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲، ۶/۴، ۱۲/۸ تهیه گردید. بهرکدام از این رقتهای سرمی، ۰/۰۵ CC از سوسپانسیون ۰/۵ درصد گلبولهای قرمز حساس شده (آنتی‌ژن اندود) اضافه گردید و پلیت‌ها (Plate) مدت ۲ تا ۴ ساعت در حرارت اطاق نگهداری گردید و سپس نتیجه قرائت شد. بالاترین رقت سرمی که آگلوتیناسیون کامل یا آگلوتیناسیون نسبی نزدیک به کامل ایجاد نموده بود بعنوان عیار آنتی‌بادی سیتومگالوویروس در سرم مورد آزمایش یادداشت گردید.

تست ثبوت مکمل - بموازات تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم با روش استاندارد ثبوت مکمل (۱۵) نیز در نمونه‌های

ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه آنتی‌ژن کشت سلولهای فیروبللاستی ربه جنین انسان (سویه ۱-Ru) که در شیشه‌های ۹۶۰ میلی لیتری تهیه شده بود با 5×10^5 TCID₅₀ سیتومگالوویروس تلقیح گردید. هنگامیکه در ۸۰ تا ۹۰ درصد کشت سلول بر اثر تکثیر ویروس ضایعه سلولی (CPE) بوجود آمد، ورقه کشت سلولی پس از شستشو با تامپون گلیسین PH=۹ جمع‌آوری گردید. سلولهای جمع‌آوری شده از چند شیشه با هم مخلوط شد و سپس بوسیله انجماد و ذوب متوالی و یافت له‌کن بمتلاشی نمودن سلولها و آزادساختن آنتی‌ژنهای ویروسی اقدام گردید. سوسپانسیون سلولهای متلاشی شده سانتریفوژ شد (۱۵ دقیقه با سرعت ۳ هزار دور در دقیقه) و مایع بالای رسوب بعنوان آنتی‌ژن جمع‌آوری گردید. به آنتی‌ژن تهیه شده دی‌میتل سولفوکسید بمقداریکه تراکم نهائی آن به ۱۰ درصد برسد اضافه گردید و تا هنگام استفاده در حرارت منهای چهل درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه تامپون‌ها - تامپون فسفات (PBS)، PH=۶/۴ با مخلوط نمودن ۱۰۰ سانتی‌مترمکعب از محلول ۰/۱۵ مولر کلوروسدیم با ۱۰۰ سانتی‌مترمکعب تامپون مرکب از CC۲۲/۳ از محلول ۰/۱۵، مولر فسفات دی‌سدیک و CC۶۷/۷ از محلول ۰/۱۵، مولر فسفات منوپتاسیک تهیه گردید.

تامپون فسفات (PBS)، PH=۷/۲ از حل نمودن ۱/۰۹۶ گرم فسفات دی‌سدیک، ۰/۳۱۵ گرم فسفات منوسدیک و ۸/۵ گرم کلوروسدیم در یک لیتر آب مقطر بدست آمد.

(محلول ۰/۱۵ مولر کلوروسدیم و ۰/۰۱ مولر فسفات منوسدیک و دی‌سدیک)، در تمام مواردی که PH، تامپون فسفات (PBS) ذکر نشده منظور تامپونی است که PH آن ۷/۲ میباشد.

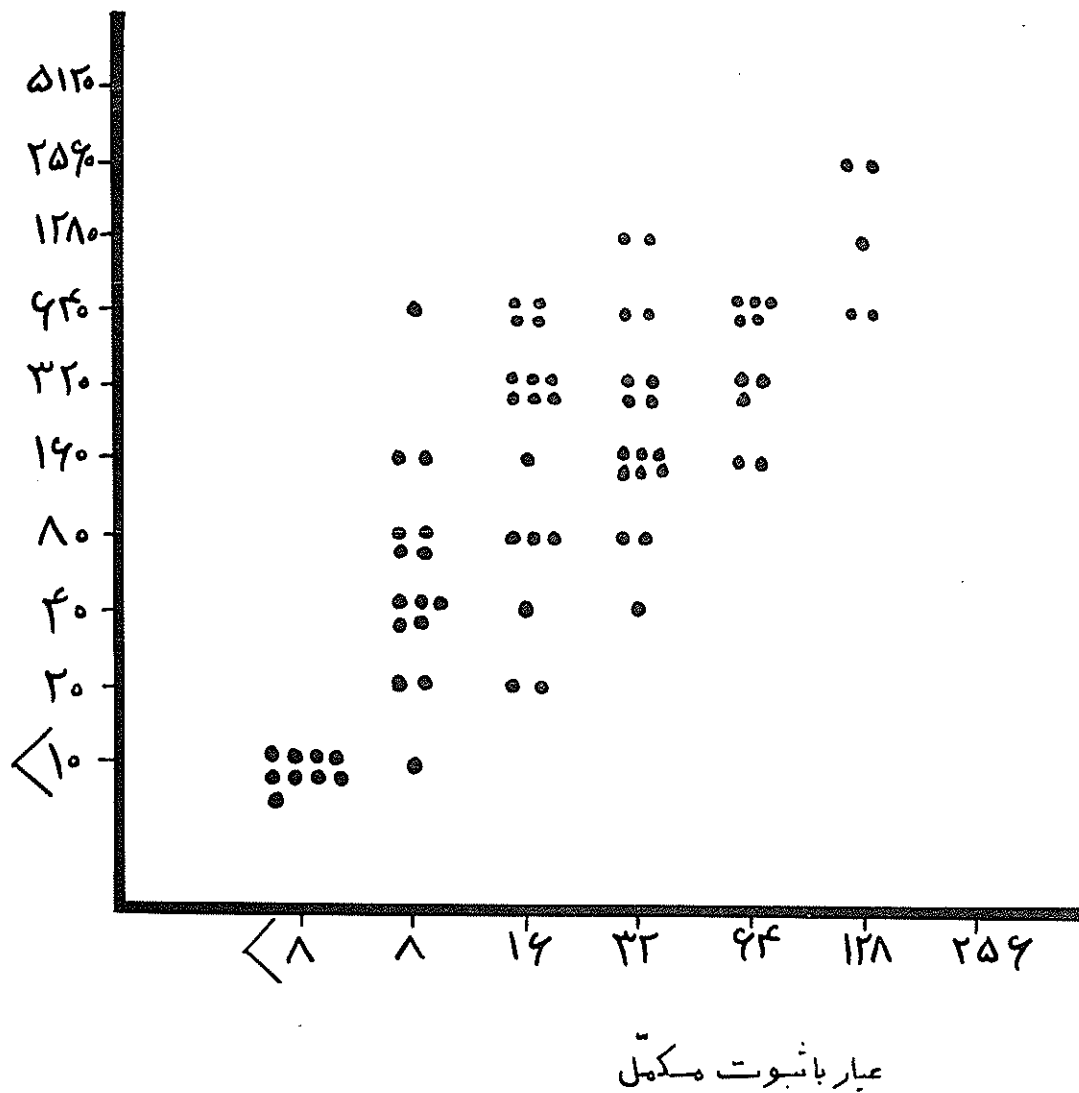
تهیه محلول رقیق‌کننده - برای رقیق کردن سرماها و تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز حساس شده گوسفند، سرم دکمپلمانه خرگوش که با PBS صدبار رقیق شده بود مورد استفاده قرار گرفت (سرم خرگوش قبلاً باید از نظر عدم آگلوتینین برای گلبول قرمز گوسفند آزمایش شود).

گلبول قرمز گوسفند - خون سیرانه گوسفند سانتریفوژ گردید و گلبولهای قرمز آن سه بار با PBS شسته شد و از آن در PBS سوسپانسیون ۲/۵ درصد تهیه گردید و همان روز بکار برده شد.

آماده کردن گلبول قرمز برای جذب آنتی‌ژن - درست قبل از شروع آزمایش محلول ۰/۲ اسیدتانیک در PBS تهیه گردید و سپس سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز گوسفند و محلول

جدول ۱ - مقایسه عیار آنتی بادی باد و روش ثبوت مکمل و هما گلو تینا سیون غیر مستقیم

عیار باهما گلو تینا سیون غیر مستقیم



بجستجو و تعیین عیار آنتی‌بادی سیتومگالوویروس افساده شد. نتایجی که از هر دو روش بدست آمد در جدولهای شماره ۱ و ۲ عرضه شده است. از مقایسه نتایج دو روش معلوم میگردد که روی هم رفته تست هماگلویتیناسیون غیرمستقیم برای تعیین عیار آنتی‌بادی سیتومگالوویروس ۲ تا ۱۰ بار حساس‌تر از تست ثبوت مکمل است. تمام نمونه‌های سرمی که با روش هماگلویتیناسیون غیرمستقیم، از نظر وجود آنتی‌بادی برای سیتومگالوویروس منفی بودند (۱۰:۱) با تست ثبوت مکمل نیز جواب منفی بدست دادند (۸:۱).

سرمی دکمپلمانته، بجستجو و تعیین عیار آنتی‌بادی سیتومگالوویروس اقدام گردید و نتایج حاصل از این دو تست با هم مقایسه شد.

نتایج

در ۷۲ نمونه از سرم انسان که از دهنندگان خون (Blood donors) بدست آمده بود و همچنین در ۱۶ نمونه سرم که از نوزادان مشکوک به عفونت سیتومگالوویروسی و مادرانشان گرفته شده بود با دو روش ثبوت مکمل و هماگلویتیناسیون غیرمستقیم

جدول ۲- تعیین عیار آنتی‌بادی در خون نوزادان مشکوک به عفونت CMV و مادرانشان با دو روش ثبوت مکمل و هماگلویتیناسیون غیرمستقیم

بیماران	زمان بعد از تولد نوزاد بر حسب روز	عیار آنتی‌بادی با روش ثبوت مکمل	عیار آنتی‌بادی با روش هماگلویتیناسیون غیرمستقیم
نوزاد	۱	۸	۳۲۰
مادر	۱	۵۱۲	۶۴۰
نوزاد	۲	۱۲۸	۳۲۰
مادر	۲	۱۲۸	۶۴۰
نوزاد	۳	۶۴	۳۲۰
مادر	۳	۶۴	۳۲۰
نوزاد	۴	۱۲۸	۳۲۰
مادر	۴	۶۴	۱۶۰

بطوریکه در روش جذب نمودن آنتی‌ژن بروی گلبولهای قرمز گوسفند ملاحظه گردید (بخش مواد و روشها) رقت ۸٪ آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفته است. تشخیص درجه رقت مناسب آنتی‌ژن از تیتراسیون آن بدست آمد. نتیجه تیتراسیون آنتی‌ژن در جدول شماره ۳ از نظر میگردد.

جدول شماره ۳- تیتراسیون آنتی ژن برای تعیین درجه رقت مناسب.

رقت‌های مختلف آنتیژن							رقت‌های مختلف
۱:۳۲	۱:۲۴	۱:۱۲	۱:۸	۱:۴	۱:۲	رقیق نشده	سرم مثبت (کنترل)
+	+	+	+	+	+	+	۱: ۱۰
+	+	+	+	+	+	+	۱: ۲۰
+	+	+	+	+	+	+	۱: ۴۰
±	+	+	+	+	±	±	۱: ۸۰
-	±	+	+	+	-	-	۱: ۱۶۰
-	-	±	+	±	-	-	۱: ۳۲۰
-	-	-	±	-	-	-	۱: ۶۴۰

بحث

وجود داشته باشد دلالت قطعی بر عفونت سیتومگالوویروسی نوزاد در داخل رحم مادر، بهنگام زایمان یا بعد از زایمان دارد زیرا در عفونت‌های سیتومگالوویروسی تولرانس ایمنونولوژیک وجود ندارد، بطوریکه جنین در داخل رحم مادر هم می‌تواند برای سیتومگالوویروس آنتی بادی بسازد. حضور آنتی بادی سیتومگالوویروس از نوع IgG در خون نوزاد، حتی با عیار بالا هم نمی‌تواند دلیل کافی بر عفونت سیتومگالوویروسی او باشد زیرا ممکن است جنین همه این نوع آنتی بادی را بطور کونژینتال از مادر دریافت کرده باشد بهمین مناسبت در تشخیص سرولوژیکی عفونت سیتومگالوویروسی نوزادان اول بسوسیل پروتین A سل وال استافیلوکوک‌ها IgG را از نمونه‌های سرمی نوزادان حذف میکنند ۷ و بعد بجهتجو و تعیین عیار آنتی بادیهای باقیمانده که از نوع IgM هستند مبادرت میکنند ولی چون این نوع آنتی بادیها (IgM) مکمل را خیلی کم ثابت میکنند بنابراین روش ثبوت مکمل در این قبیل موارد نمیتواند جواب درست بدست بدهد اما بروش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از این نظر ایرادی وارد نیست.

۴- در تعیین عیار آنتی بادیهای نوع IgG هم حساسیت هماگلوتیناسیون غیرمستقیم بیشتر از تست ثبوت مکمل است زیرا برخی از زیر کلاسهای IgG مکمل (کمپلمان) را ثابت نمیکند.

(۱)

جستجو و تعیین عیار آنتی بادی برای سیتومگالوویروس با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از چند جهت بروش ثبوت مکمل که برای همین منظور مورد استفاده قرار میگیرد رجحان دارد.

۱- بطوریکه در شرح نتایج ملاحظه میگردد حساسیت روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم برای تعیین عیار آنتی بادی سیتومگالوویروس خیلی بیشتر از تست ثبوت مکمل است، علاوه بر این بنظر ما چون در تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم احتیاجی به تیتراسیون کمپلمان و سرم همولتیک و شاهد‌های متعدد نمیباشد بنابراین امکان خطا کمتر و سرعت عمل بیشتر است.

۲- بطور تکراری (ده بار) به فواصل زمانی متفاوت با هر دو تست در پنج سرم مثبت به تعیین عیار آنتی بادی سیتومگالوویروس اقدام گردید و در مقایسه نتایج بدست آمده ملاحظه شد که توازن و ثبات جوابها در تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم خیلی بیشتر از تست ثبوت مکمل است.

۳- آنتی بادیهای نوع IgG میباشند میتوانند از جفت عبور کنند و از مادر به جنین منتقل گردند ولی آنتی بادیهای نوع IgM هستند از جفت عبور نمیکند بنابراین اگر در خون نوزاد آنتی بادی سیتومگالوویروس از نوع IgM هم

Reference

1. Benyesh-Melnick, M., Vonka, V. and Wimberly, I., *J. Immunol.*, 96:261,1966
2. Bernstein, M.T. and Stewart, J.A., *Appl. Microbiol.* 21:84, 1971
3. Hanshaw, J.B., Betts, R.F. and Simon, G., *New Eng. J. Med.*, 272:602,1965
4. Hanshaw, J.B., *Adv. in Teratology*, Vol. 4, 1970
5. Hanshaw, J.B., *Inf. Dis.*, 123:555,1971
6. Kaariainen, L., Klemola, E. and Paloheimo, J., *Brit. Med. J.*, 1:1270,1966
7. Kiai, F. and Stewart, J.A., *A. S. M.*, 77th. Annual Meeting, Session 206, Abst. 424, 1977
8. Levinsohn, E.M., Foy, H.M. and Kenn, G.E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132: 957, 1969
9. McCracken, G.H. and Shinefield, H.R., *Am. j. Dis. Child.*, 117:522,1969
10. Plummer, G. and Benyesh-Melnick, M., *Proc. Exp. Biol. Med.* 117:145,1964
11. Rosenthal, J. D., Notkins, A. L., *Appl. Microbiol.* 25:569 ,1973
12. Rowe, W. P., Hartley, J. W. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92:418,1956
13. Rowe, W. P., Hartley, J. W. et al., *Am. J. Hyg.*, 67:57,1958
14. Smith, M. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92:424,1956
15. Starr, J. G., Calafior, D. and Casey, H. L., *Am. J. Epidem.*, 86:507,1967
16. Toghill, P. J., Bailey, M. E. and William, R., *Lancet*, 1:1351,1967
17. Weller, T. H., Macauley, J. C. and Craig, J. M., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 94:4,1958
18. Weller, T. H., Hanshaw, J. B. and Scott, D. E., *Virology*, 12:130,1960
19. Weller, T. H. and Hanshaw, J. B., *New Eng. J. Med.* 266:1233,1962