Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

مجله دانشکده پزشکی تهران
شماره پنجم و ششم ــ بهمن و اسفندماه ۲۵۳۶ صفحه ۱۲۹

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

دکتر فخرالسادات محمدزادهٔ کیائی

خلاصه

نظر بانیکه برنامه‌ای برای مطالعه چگونه انتشار سیتومگالوویروسها در ایران تهیه گردیده است و تحقیق در این مورد با روشهای 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 دهندگان خون (Blood donors) و ۱۶ نمونه سرمی که از نوزادان مشکوک به‌عفونت سیتومگالوویروسی و مادرانشان بدست آمده بود به‌جستجو و تعیین عیارآنتی بادی سیتومگالوویروس مبادرت گردید. در این مقاله مختصری از اهمیت سیتومگالوویروسها در پاتولوژی انسانی، نتایج حاصل از مقایسهٔ حساسیت دو تست ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم و همچنین روش مناسب برای تهیه و تیتراسیون آنتی‌ژن سیتومگالوویروسی از نظر میگذرد.

مقدمه

سیتومگالوویروسهایا CMV از نظر کلاسیفیکاسیون جزو ویروسهای گروه تبخال زا (Herpesviruses) هستند و با ویروسهای هرپس سیمپلکس، آبله‌مرغان ــ زناو EB (Epstein-Barr) 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 فیبروبلاستی انسان، در سلولهای هیچکدام از جانوران دیگر تکثیر حاصل نمیکنند. سلولهای آلوده با سیتومگالوویروس متورم میشوند بطوریکه براثر افزایش حجم اندازهٔ آنها تا چهل میکرن هم میرسد و در داخل هسته آنها انکلوزیونهای اسیدوفیل درشتی در حدود ۱۵ میکرن بوجود میآید. سلولهائی با این مشخصات در غدد بزاقی ۱۰ تا ۲۰ درصد از کودکان سالم کمتر از ۵ سال که براثر 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 مینمانید. (۵ ــ ۸ ــ ۱۳) دفع ویروس بالاخره پس از گذشت مدتی قطع میگردد در صورتیکه ممکن است خود ویروس حتی‌تاآخرعمربحال کمون در داخل سلولها باقی بماند. هرچه عفونت در سنین بالا رخ بدهد مدت زمان دفع ویروسی کوتاهتر است. گرچه سیتومگالوویروسها بشدت انتشار دارند مع‌الوصف تا

گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

سال ۱۹۵۶ بوجود آنها پی‌برده نشد تکمیل‌شدن روشهای کشت سلولی و استفاده از آن برای کشت ویروسها سبب شناسائی سیتومگالوویروسها گردید (۱۲ ــ ۱۴ ــ ۱۷) و مطالعات بعدی اهمیت فوق‌العاده آنها را در پاتولوژی انسانی مخصوصا در پاتولوژی جنین و نوزادان مشخص نمود و ثابت گردید که عامل یک درصد از مرگ‌ومیرهای نوزادان و مسئول اکثر میکروسفالیها همین ویروسها هستند. در پیش بانوان اگر عفونت در دوران حاملگی اتفاق بیافتد و یا براثر عفونت پیشین هنوز هم دافع ویروس مانده باشد، جنین در داخل رحم و یا بهنگام تولد با ویروس آلوده میشود و نوزاد به‌بیماری انکلوزیون سیتومگالیک مبتلا میگردد. هپاتواسپلنومگالی توأم با یرقان، پورپورای ترمبوسیتوپنیک و آنمی همولتیک از علائم بارزعفونت 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، عقب‌ماندگی فکری و میکروسفالی ظاهر میگردد (۹). یکی دیگر از عوارض شایع عفونتهای سیتومگاویروسی نوزادان کوریوررتینیت است که اغلب باعث اشتباه عفونتهای سیتومگالوویروسی باتوکسوپلاسموزکونژنیتال میشود (۱۹). با وجود این طی سالهای اخیر گزارشاتی از عفونتهای داخل رحمی باسیتومگالوویروسها 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 بعلت پیوند کلیه، لوسمی و یا سرطان بمدت طولانی با مواد ایمونوسوپرسیو تحت درمان قرار میگرند، 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 درگیرندگان مکرر خون بروز میکند و با تب و افزایش تعداد منونوکلئرهای غیرطبیعی همراه است (۶).

مطالبی که دربارهٔ پاتوژنز و مشخصات بیولوژیکی سیتومگالوویروسهای انسانی گفته شد ارزش و اهمیت فوق‌العاده 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 به‌جداکردن 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 عصارهٔ نسوج به‌کشت سلولهای فیبروبلاستی انسان که تنها سیستم سلولی حساس میباشد تلقیح میگردد. تکثیر ویروس در کشت سلول بکندی صورت میگیرد و بدست‌آوردن نتیجه قطعی سه تا شش هفته بطول می‌انجامد ضمنا نباید از نظر دور داشت که در مواردی با وجود حضور ویروس در برداشتها، اقدام به‌جداکردن ویروس به‌نتیجه مثبت منتهی نمیگردد. مطلب مهم دیگر اینکه جداکردن ویروس از افرادیکه حامل ویروس هستند ولی دافع آن نمیباشند 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 تأئید گردد ضمنا در مطالعات اپیدمیولوژیکی، تنها روشهای سرولوژیکی قابل اجرا است.

چهار روش سرولوژیکی بطور متداول برای جستجو و تعیین عیارآنتی 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 نتیجهٔ مواجه‌بودن به‌کندی تکثیر ویروس، برای آزمایش نمونه‌های سرمی که تعداد آنها زیاد باشد قابل اجرا نیست. روش رادیوایمونواسی بسیار حساس است ولی مستلزم تجهیزات بسیار گرانقیمتی است که تهیه‌اش بسادگی مقدور نمیباشد ولی روشهای ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم را برای جستجو و تعیین عیارانتی بادی CMV در هر آزمایشگاهی بسهولت میتوان پیاده نمود.

نظر باینکه برنامه‌ای برای مطالعهٔ چگونگی انتشار سیتومگالوویروسها در ایران تهیه گردیده است و تحقیق در این مورد منحصرا با روشهای سرولوژیکی امکان‌پذیر است بنابراین دو روش ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم از نظر حساسیت با هم مقایسه گردید تا روش حساس‌تر در مطالعه سرواپیدمیولوژیک CMV ما مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

تهیه آنتی‌ژن ــ آنتی‌ژن استاندارد سیتومگالوویروس از سویهٔ AD ــ ۱۶۹ ویروس تهیه گردید و این آنتی‌ژن در هر دو تست

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه آنتی‌ژن کشت سلولهای فیبروبلاستی ریهٔ جنین انسان (سویهٔ ۱ــRu) که در شیشه‌های ۹۶۰ میلی لیتری تهیه شده بود با 5×10^{5} TCID ۵۰ سیتومگالوویروس تلقیح گردید. هنگامیکه در ۸۰ تا ۹۰ درصد کشت سلول براثر تکثیر ویروس ضایعهٔ سلولی (CPE) بوجود آمد، ورقهٔ 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 بافت 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. به‌آنتی‌ژن تهیه شده دی‌میتل سولفوکسید بمقداریکه تراکم نهائی آن به۱۰ درصد برسد اضافه گردید و تا هنگام استفاده در حرارت منهای چهل درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه تامپون‌هاــ تامپون فسفات (PBS)، PH=۶/۴ با مخلوط نمودن ۱۰۰ سانتی مترمکعب از محلول ۱۵/. مولرکلرورسدیم با ۱۰۰ سانتی مترمکعب تامپون مرکب از CC۳۲/۳ از محلول ۱۵/. مولر فسفات دی‌سدیک و CC۶۷/۷ از محلول ۱۵/. مولر فسفات منوپتاسیک تهیه گردید.

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

(محول ۰/۱۵ مولرکلرورسدیم 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 رقیق‌کنندهــ برای رقیق‌کردن سرمها و تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز حساس شده گوسفند، سرم دکمپلمانتهٔ خرگوش که با PBS صد بار رقیق شده بود مورد استفاده قرار گرفت (سرم خرگوش قبلاً باید از نظر عدم آگلوتینین برای گلبول قرمز گوسفند آزمایش شود).

گلبول قرمز گوسفندــ خون سیتراتهٔ 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.

آماده‌کردن گلبول قرمز برای جذب آنتی‌ژنــ درست قبل از شروع آزمایش محلول ٪..... اسیدتانیک در PBS تهیه گردید و سپس سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز گوسفند و محلول اسید تانیک بحجم مساوی با هم مخلوط شد و بمدت ده دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بوسیلهٔ سانتریفوژکردن (۱۵۰۰ دور در دقیقه) گلبولها از اسید تانیک جداکردید 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)ــ چهار حجم از PBS، Ph=۶/۴ با یک حجم از رقت ٪ آنتی‌ژن و یک حجم از سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز گوسفند که با اسید تانیک عمل‌شده بود با هم مخلوط گردید و مدت نیمساعت در حرارت اطاق بحال خود گذاشته شد. گلبولهای قرمز بوسیله سانتریفوژکردن (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 سرمیــ تمام نمونه‌های سرمی پس از ده بار رقیق‌شدن بوسیله مایع رقیق‌کننده، بمنظور از بین‌بردن کمپلمان (اینا‌کتیواسیون) مدت نیمساعت در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بازاء هر CC از سرم دکمپلمانته 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 اگلوتینین وجود داشته باشد جذب گردد. سرمها بوسیله سانتریفوگاسیون از گلبول قرمز جدا گردید و باین ترتیب برای آزمایش (جستجو و تعیین عیار CMV آنتی‌بادی) آماده گردید.

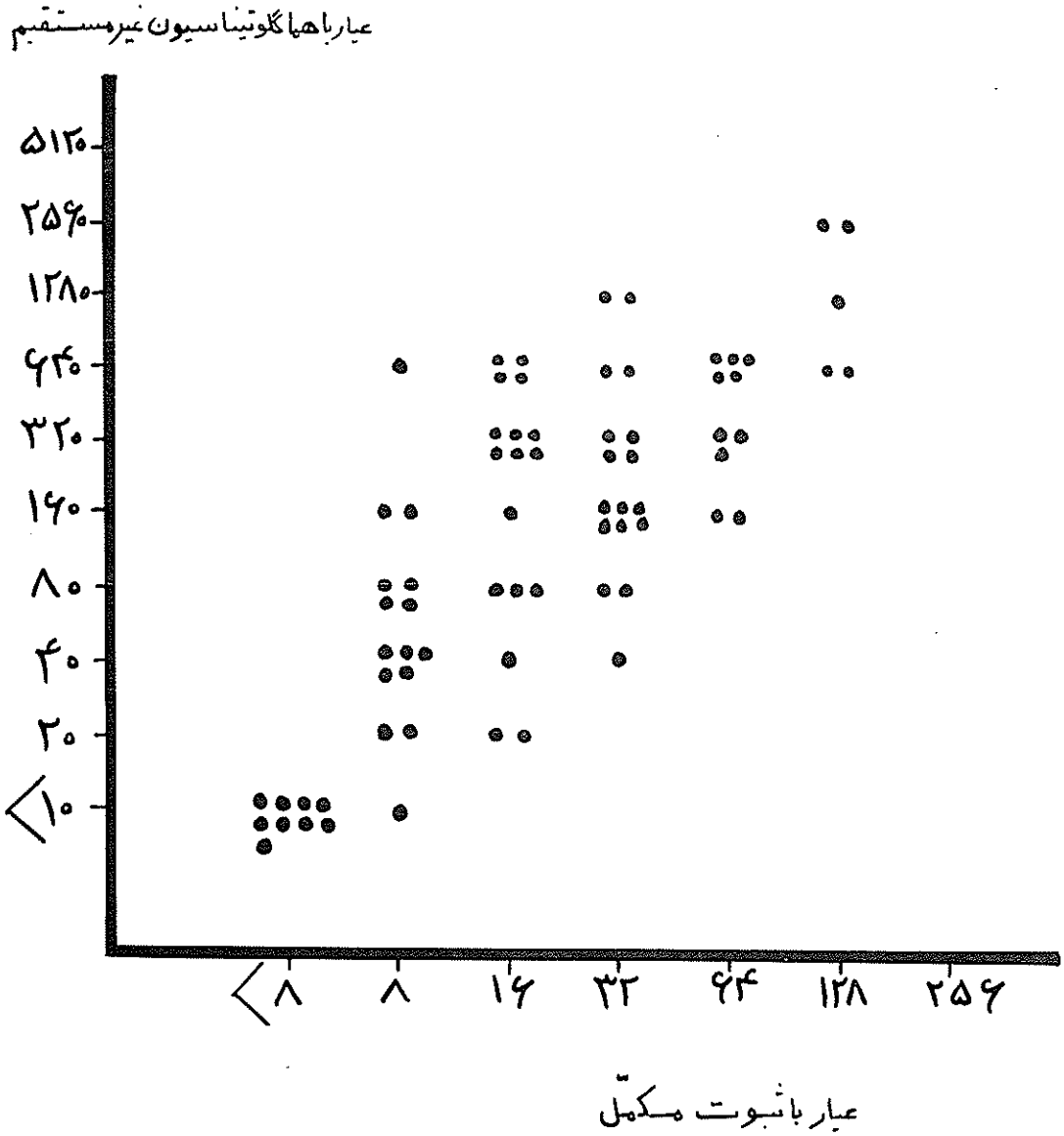
روش انجام تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

با استفاده از میکروسیستم تاکاتسی ۰/۰۵ از هر نمونه سرمی که در جریان اینا‌کتیواسیون ده بار رقیق شده بود رقتهای ٪۰، ٪۰، ٪۰ ..... ٪۰۰۰ 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 به‌کامل ایجاد نموده بود بعنوان عیار آنتی‌بادی سیتومگالوویروس در سرم مورد آزمایش یادداشت گردید.

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

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

جدول ۱ - مقایسهٔ عیار آنتی بادی با دو روش ثبوت مکمل و هما گلوتیناسیون غیرمستقیم



Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

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

نتایج

در ۷۲ نمونه از سرم انسان که از دهندگان خون (Blood donors) بدست آمده بود و همچنین در ۱۶ نمونه سرم که از نوزادان مشکوک به‌عفونت سیتومگالوویروسی و مادرانشان گرفته شده بود با دو روش ثبوت مکمل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم بجستجو و تعیین عیارآنتی‌بادی سیتومگالوویروس اقدام 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 روی‌هم‌رفته تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم برای تعیین عیارآنتی بادی سیتومگالوویروس ۲ تا ۱۰ بار حساس‌تر از تست ثبوت مکمل است. تمام نمونه‌های سرمی که با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، از نظر وجود آنتی بادی برای سیتومگالوویروس منفی بودند (۱:۱۰)) با تست ثبوت مکمل نیز جواب منفی بدست دادند (۱:۸)).

جدول ۲ ــ تعیین عیارآنتی‌بادی در خون نوزادان مشکوک به‌عفونت CMV و مادرانشان با دو روش ثبوت مکمّل و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم

بیماران		زمان بعد از تولد نوزاد برحسب روز	عیارآنتی‌بادی با روش ثبوت مکمل	عیارآنتی‌بادی با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم
نوزاد	۱	۳۵	۸	۳۲۰
مادر	۱	۳۵	۵۱۲	۶۴۰
نوزاد	۲	۱۵	۱۲۸	۳۲۰
مادر	۲	۱۵	۱۲۸	۶۴۰
نوزاد	۳	۷	۶۴	۳۲۰
مادر	۳	۷	۶۴	۳۲۰
نوزاد	۴	۳	۱۲۸	۳۲۰
مادر	۴	۳	۶۴	۱۶۰

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

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

جدول شماره ۳ــ تیتراسیون آنتی‌ژن برای تعیین درجه رقت مناسب.

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

بحث

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

۱ ــ 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 به‌تیتراسیون کمپلمان و سرم همولتیک و شاهدهای متعدد نمیباشد بنابراین امکان خطا کمتر و سرعت عمل بیشتر است.

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

۳ ــ آنتی بادیهائی که از نوع IgG میباشند میتوانند از جفت عبور کنند و از مادر به‌جنین منتقل گردند ولی آنتی بادیهائی که از نوع IgM هستند از جفت عبور نمیکنند بنابراین اگر در خون نوزاد آنتی بادی سیتومگالوویروس از نوع IgM هم 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 ایمونولوژیک 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 همهٔ این نوع آنتی بادی را بطور کونژنیتال از مادر دریافت کرده باشد بهمین مناسبت در تشخیص سرولوژیکی عفونت سیتومگالوو ویروسی نوزادان اول بوسیلهٔ پروتئین A سل وال استافیلوکک‌ها IgG را از نمونه‌های سرمی نوزادان حذف میکنند [۷] و بعد بجستجو 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 ــ 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 نمیکنند. (۱)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:03 IRST on Saturday January 20th 2018

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