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*

در جریان ۱۰ سال اخیر علم ویروس شناسی برق آسا پیش‌تاخته و رقم ویروسهای شناخته شده بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. این علم نه تنها به ذات‌خود شتابان پیش میرود بلکه سیر تکاملی بیولوژی ویرال پرده‌ها از راز زندگی می‌چیند و بشر را قدم به قدم به خاستگاه حیات نزدیکتر میسازد.

مطالعه خواص بیولوژیکی اسیدهای هسته‌ای خالص و متبلورکه از ویروسها جدا شده بود در زیست‌شناسی انقلاب بوجود آورد و مفهوم کلیهٔ زندگی را یکباره دگرگون ساخت، قسمت‌مهمی از تحقیقات و بررسیهای مربوط به مسائل حیاتی از موجود زنده به ملکول منتقل گردید و رشته‌جدیدی بنام بیولوژی ملکولی‌بنیان گرفت.

ویروس شناسی در اواخر قرن نوزدهم بوجود آمد ولی تا نیمه‌های قرن بیستم پیشرفت آن بسیارکند و بطئی بود. دربین عواملی‌که سبب پیشرفت سریع ویرولوژی گشته‌و موجبات گسترش جهانی آنرا فراهم ساخته است در درجه اول باید از تکمیل شدن تکنیک‌های کشت سلول و استفاده ازآن در ویروس‌شناسی‌یادکرد. روش‌های جدیدکشت سلول راه را برای جهش ویرولوژی باز نمود و بمطالعات و تحقیقات با ارزش بیشماری امکان داد. بطوریکه میدانیم ویروسها جز در داخل سلولهای زنده قادر به تکثیرنمیباشند لذا از اواخر قرن نوزدهم تا سال ۱۹۳۱ برای کشت و مطالعه ویروسها منحصراً از جانوران زنده و از این تاریخ تا نیمه‌های‌قرن بیستم از تخم‌مرغ جنین‌دار و دامها تواماً استفاده میشد. در بین جانوران هم بیشتر اوقات میمون مورد استفاده قرار میگرفت ولی قیمت نسبتاً گران میمون و سایر دامها، هزینه‌گزاف نگهداری و پذیرائی از آنها ، وجود ویروسهای نهفته در بدن جانوران مورد استفاده ، فقدان جانور حساس به برخی ازویروسها، مشکلات‌انجام آزمایشات در روی حیوانات و بالاخره متغیر بودن درجه حساسیت افراد یک‌گونه، از مسائلی بودندکه جداً از پیشرفت ویرولوژی ممانعت و تحقیق وبررسی را در این زمینه بینهایت مشکل‌وپرخرج میساختند. از اینرو تحقیقات ویروس‌شناسی‌فقط در انحصارآزمایشگاه هائی بودکه امکانات اقتصادی بسیار زیادی داشتند.

بنظر میرسدکه ذکر مثال زیر برای نشان دادن مشکلات کارتحقیقات ویرولوژیکی در عهدیکه ازجانور بعنوان محیط‌کشت استفاده میشد مناسب باشد:

تحقیقات مربوط به نشان دادن اینکه ویروس فلج اطفال سه تیپ آنتی‌ژنیک دارد در روی میمون انجام گرفت، برای این کار چند گروه از کارشناسان تحت سرپرستی مؤسسه ملی مبارزه بافلج اطفال آمریکا بمدت دو سال در چهار دانشگاه بزرگ ایالات متحده کار وکوشش کردند و متجاوز از بیست‌هزار میمون مورد استفاده قرارگرفت تا اینکه تعداد سروتیپ‌های ویروس پولیومیلیت بطور یقین شناخته شد. کاری‌که سابقاً اینهمه مشکل و پرخرج بود درسایه استفاده ازکشت سلول امروزه بقدری ساده وآسان شده‌است که براحتی در عرض دوسه‌روز در تمام آزمایشگاههای ویرولوژی انجام میگیرد.

برای تعدادی از ویروسها جانور حساس وجود ندارد لذا تا زمانیکه ازدامهای زنده و جنین جوجه برای کشت ومطالعه ویروسها استفاده میشد بوجود آنها پی‌برده نشد. تعداد این‌ویروسها امروزه متجاوز از صد میباشدکه استفاده از کشت سلول سبب شناسائی ومطالعه آنها گردیده است. مواردکار بردکشت سلول در ویروس‌شناسی بقرار زیر است:

جداکردن ، تشخیص هویت، تیتراسیون ویروسها، تعیین

* دپارتمان میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

هویت و تیتراسیون آنتی‌کورهای 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 وپیدایش نئوآنتی‌ژنها و انترفرون در سلولهائیکه میزبان ویروس میباشند.

در حال حاضر غیر از ویروس شناسی رشته‌های دیگری نظیر باکتریولوژی ، پارازیتولوژی ، ایمونولوژی ، سیتولوژی ، بیولوژی و بیولوژی مولکولی ، فارماکولوژی، وکانسرولوژی نیز درکارهای تحقیقاتی خود ازکشت بافت‌وکشت سلول استفاده مینمایند و زمینه استعمال‌آنها روز بروز گسترش مییابد. هم‌اکنون که ازکشت بافت سخن بمیان آمد لازم است متذکر شویم که‌از سال ۱۸۸٤ تا ۱۹۵۲ تحقیقات ومطالعاتی 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 نام‌می‌بریم. کشت سلول از سال ۱۹۵۲ ببعد متداول گردیده است. نباید تصور نمود که پیشرفتهای حاصله در زمینه کشت‌بافت‌وکشت سلول بخاطر ویروس شناسی بوده است، حقیقت اینست که‌فعالیت‌های مربوط به‌کشت بافت‌های جانوران قبل از پیدایش‌علم‌ویروس شناسی آغازگردیده است. در بین تحقیقاتی‌که از سال ۱۸۸٤ تا ۱۹۰٦ در زمینه نسج انجام‌گرفته از همه مهمترکارهای روس-گرانویل‌هاریسون[۱۱] میباشدکه در تمام دنیا بعنوان پایه و شالوده حقیقی کشت بافت شناخته شده است . در سال ۱۹۱۲ کارل (Carrel) [۲] با استفاده از روشهای هاریسون وکشف این موضوع که عصاره جنین مرغ و پستانداران اثر اعجازآمیزی در رشد بافت‌های‌کشت شده دارد موفق‌گردید نسوجی راسالهادر خارج از بدن زنده ودرحال رشد نگهدارد. درآن زمان‌که هنوز آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته نشده بودند یکی‌از مشکلات‌مهم کارشناسان آلودگیهای میکربی وقارچی بود که‌اکثراً درکشت‌های بافت‌بروز میکرد و زحمات را بهدر میداد ،باوجود این دقت‌وظرافت کارهای کارل بحدی بودکه توانست قطعه‌ای از بافت جنین جوجه‌رابمدت ۳۲ سال در خارج از بدن زنده و در حال رشد نگهدارد. بتدریج کارشناسان زیادی دنبال‌کارکشت‌بافت راگرفتند وآن‌را بتکامل بردند.

درآغازکار برای زنده نگهداشتن و پرورش قطعات نسج در خارج از بدن آنها را در محیط‌های مغذی طبیعی نظیر لنف ، پلاسما وعصاره جنین پستانداران یا جنین جوجه‌کشت میدادند ولی بموازات تکامل روشهای کشت بافت، احتیاجات غذائی ومتابولیکی بافتهای کشت داده شده بادقت مورد بررسی قرارگرفت ومحیط‌های کاملا مصنوعی و یانیمه مصنوعی نیز برای کشت‌آنها ساخته شد. آماده شدن محیطهای مغذی مناسب برای کشت‌نسج وکشف‌آنتی‌بیوتیک‌ها راه را برای رسیدن به‌کشت سلول هموار ساخت. با علم باین موضوع که‌ویروسها جز در بطن سلولهای‌زنده قادر بتکثیر نمیباشند، ویرولوژیست‌ها خیلی زود توجه‌خودرابه‌کشت بافت معطوف نمودند :

اشتین هارد (Steinhardt) برای نخستین بار در سال ۱۹۱۳ [۲۵] امکان تکثیر ویروس واکسن را درکشت قرنیه خرگوش نشان داد. تا سال ۱۹۲۵ دیگر در این مورد تحقیقی انجام نگرفت. از این تاریخ ببعد مجدداً فعالیت برای نشان دادن تکثیر ویروسها درکشت بافت آغازگردید وکارشناسانی نظیرپارکر وهمکاران[۲۱]، کارل[٤-۳]، مایتلند و همسرش[۱۰] وبالاخره آندرس(۹) در این خصوص به تحقیق و بررسی پرداختند و بنتایج بسیار مهم و با ارزش دست یافتند. گرچه بررسیهای پژوهندگان نامبرده امکان تکثیر ویروسها را درکشت بافت مسلم ساخت ولی چون مشکلات زیادی برای‌نشان‌دادن شواهد تکثیر ویروس برروی قطعات نسج وجود داشت لذا استفاده ازکشت بافت برای کشت ومطالعه ویروسها جنبه عملی زیادی پیدا نکرد و برای پیشرفت‌این رشته آنطوریکه تصور میرفت مفید واقع نگردید.

همانطوریکه قبلا نیز نگاشته شد ویروس شناسی ترقی و پیشرفت سریع خودرا به‌کشت سلول مدیون است که از سال ۱۹۵۲ ببعد متداول و برای کشت و مطالعه ویروسها مورد استفاده قرار گرفت [٥]. ارزش و اهمیت فوق‌العاده کشت سلول برای ویروس شناسی و مزیت و برتری آن برکشت بافت در این است‌که اغلب ویروسها ضمن تکثیر درکشت سلول باعث استحاله یاخته‌ها میگردند ویا آسیبهائی ایجاد میکنند که‌مستقیماً در زیر میکروسکپ های معمولی بوضوح قابل رؤیت است ودلالت‌بروجود ویروس و تکثیر آن مینماید . در مواردی‌که تکثیر ویروس درکشت سلول بدون ایجاد آسیبهای قابل رؤیت انجام میگیرد، میتوان با استفاده از روشهای تولید پلاك، انترفرانس، همادسورپسیون‌وایمونوفلوئورسانس بوجود آن پی‌برد.

انواع کشت سلول

تهیه کشت سلول به‌مقدار زیاد بآسانی امکان پذیرمیباشد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

امروزه 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 [۳-۱٤] 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 آن‌را بکمک قیچی استریل به قطعات ۱-۲ میلی متری تقسیم مینمایند ، قطعات نسج را چند بار با یک محلول نمکی ایزوتونیک معادل نظیرمحلول هنکس، ارل‌ویا P.B.S (Phosphate-buffered saline) می‌شویند تا خون موجود زایل شود، آنگاه تکه‌های بافت را در محلول ۲ درهزار تریپسین در P.B.S. که فاقد یونهای کلسیم و منیزیم باشد می‌ریزند (باتوجه به نوع بافت ممکن است بجای تریپسین از ورسن، کلاژنازویاپروناز استفاده شود) مخلوط تریپسین و قطعات نسج را در حرارت ۲۰-۳۰ درجه سانتی گراد 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 ٤ درجه قرار میدهند و بروی تکه‌های هضم نشده دوباره تریپسین تازه میریزندو مخلوط را تکان‌میدهند. این کار را آنقدر ادامه میدهند تا تقریباً همه یا قسمت اعظم سلولهای متشکله بافت ازهم جدا گردند. بوسیله سانتریفوگاسیون سلولها را از محلول تریپسین جدا و پس از دوبار شستشو بامحلول هنکس یاارل آنها را در محیط غذائی مناسب معلق میسازند. اگر این سوسپانسیون‌را در شیشه‌های کتابی‌بریزند ودرگرمای ۳۷ درجه سانتی گراد قراردهند یاخته‌ها به سطح جداری از شیشه که بامایع در تماس است می‌چسبند و شروع به تکثیر مینمایند بطوریکه در عرض چند روز تمام سطح مزبور از یک ورقه سلولی تک‌لایه پوشیده میشود ، دراین مرحله اگر مایع غذائی کشت سلول را دور بریزند و برروی‌ورقه سلولی که بجدار شیشه چسبیده است‌محلول 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 وپس از شستشو و تعلیق در محیط مغذی ، محصول یک شیشه را در دو یا سه شیشه‌دیگر که باندازهٔ شیشه اولی هستند وارد میسازند. این‌عمل را پاساژ یا رپیکاژمیگویند.

اغلب کشت‌های سلولی که بطریق بالا از هضم آنزیمی بافتهای جانوری‌بدست میآیند پس از چند پاساژ قدرت تکثیرخودرا ازدست‌داده و از بین‌میروند. این کشتها را کشتهای نخستین سلول میگویند. کشت‌های‌نخستین‌سلول‌در مرحله‌اولیه زندگی In-Vitro خود مورد استفاده قرار میگیرند وازبین میروند. برای تهیه مجدد آنها الزاماً از سلولهای بافت تازه که از جانور زنده گرفته میشوند استفاده‌میکنند.

۲- کشت‌های سلولی رده پیوسته

اگر کشت‌های سلولی را در شرایط مخصوص ودرمحیط های غذائی بسیار غنی پاساژ دهندگاهی اتفاق میافتد که‌تعدادی از سلولهای یک کشت که قدرت‌آداپتاسیون آنها زیاد است‌بزندگی (In - Vitro) عادت میکنند و در صورت پاساژهای مرتب و بموقع سالهای سال بزندگی و تکثیر خود ادامه میدهند. کشت‌هائی 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 بسلولهای بد خیم تبدیل نگردند نمیتوانند رده سلولی بوجود بیاورند. بعبارت دیگر در جریان پاساژهای مکرر آداپته‌شدن‌سلول های بافت سالم‌بزندگی‌در خارج از بدن و تبدیل آنها به سلولهای رده پیوسته براثر ترانسفورماسیون سلولها صورت میگیرد . اگر سلولهای رده پیوسته را که از بافت سالم بدست آمده است به‌حیوان دیگری از همین گونه پیوند کنند درمحل پیوند توسور 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 سلولی‌در سال ۱۹۵۲ توسط Gey [۱۰] ازیک کارسینوم گردن رحم بدست آمده وردهسلولی‌هلا (Hela) نام دارد ودر اغلب آزمایشگاههای ویروس شناسی نگهداری شده و مورد استفاده قرار میگیرد. تعداد تیره‌های‌سلولی روز بروز افزایش مییابد واهمیت آنها برای آزمایشگاههای ویروس شناسی فوق‌العاده زیاد است. از تیره‌های سلولی در زمینه‌هائیکه قبلا تحت عنوان موارد کاربرد کشت سلول ذکر گردیده است استفاده میشود ، با این تفاوت که در روی رده‌های سلولی نمیتوان برای انسان‌واکسن

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

های ضد بیماریهای ویروسی تهیه نمود درصورتیکه انجام این کار در مواردی برای دامها بلامانع میباشد. چون نگهداری وپاساژ رده‌های سلولی نسبتاً آسان بوده و مستلزم مخارج گزاف نیزنمیباشد لذا این قبیل کشتهای سلولی برای آزمایشگاههای کوچکی که امکانات فنی و اقتصادی زیادی ندارند خدمت بزرگی انجام میدهند .

کشت‌های 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، درصورتیکه این مسئله در مورد کشتهای رده پیوسته مطرح نیست. از مزایای دیگری که میتوان در مورد رده‌های سلولی یادآورشد این است که حساسیت برخی از آنها برای تعدادی از ویروسها خیلی بیشتر از کشتهای نخستین سلول میباشد[۱۲].

رده‌های سلولی‌موجود دربخش‌میکروبیولوژی دانشکده پزشکی:

چون ممکن است اکثر همکاران ارجمند ما در تهران یا شهرستانها برای کارهای‌روزانه آزمایشگاهی ویا فعالیتهای‌تحقیقاتی و تعلیماتی خود به برخی از رده‌های سلولی که در اختیارندارند، نیاز پیدا کنند، لذا جناب آقای دکتر شفا مدیر محترم گروه‌میکروب شناسی و ایمونولوژی یادآورشدند که در این فرصت رده‌های‌سلولی موجود در بخش میکروبیولوژی‌باطلاع برسد تا چنانچه موردحاجت همکاران گرامی باشد در اختیار آنان قرار داده شود.

هم‌اکنون در بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه‌تهران‌شش‌نوع رده سلولی‌دائماً پاساژ ونگهداری‌میشوند که عبارتنداز: رده‌های HeLa، KB، HeP_2، Vero، Am_{57} و RK_{13}

۱- رده سلولی هلا HeLa درسال ۱۹۵۲ توسط Gey [۱۰] از یک کارسینوم گردن رحم جدا گردیده و از شناخته شده‌ترین و پرمصرف‌ترین تیره‌های سلولی دنیا میباشد . سلولهای هلا بتعداد زیادی از ویروسهای جانوری حساس است [۱۷].

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

۳- رده‌سلولی HeP_2 درسال ۱۹۵۵ توسط مور (Moore) وهمکارانش[۱۸] از یک کارسینوم‌لارنکس‌جدا شده است واز نظر حساسیت به‌ویروسهادر ردیف‌رده‌های هلا Hela و KB قراردارد.

۴- رده سلولی آمنیوس۵۷ ($Amnios_{57}$) که آنرا رده سلولی Am_{57} نیز میگویند درسال ۱۹۵۸ توسط Mayer [۱۶] ازسلولهای غشاء آمنیون جفت انسان بدست آمده است و حساسیت آن مخصوصاً نسبت به آنتروویروسها بیشتر از سلولهای هلا وKB گزارش شده است[۱۹].

۵ - رده سلولی RK_{13} (Rabbit Kidney) درسال۱۹۶۳ توسط Beale [۱] از سلولهای کلیه بچه خرگوش بدست آمده است و برای مطالعه ویروس روبئول‌وپاکس ویروسها مناسب میباشد[۲۰]

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

مبداء و تاریخ وصول رده‌های سلولی نامبرده در جدول زیر خلاصه شده است :

مبدأ و تاریخ وصول رده‌های سلولی

نام رده سلولی	مبدأ	تاریخ وصول
Hela	انستیتو رازی (حصارك)	۱۳۴۰/ ۲/۲۲
KB	انستیتو میکروبیولوژی‌لوزان (سویس)	۱۳۴۰/ ۳/۱۰
Am_{27}	آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکد بهداشت (تهران)	۱۳۴۷/۱۰/۱۶
HeP_2	آزمایشگاه‌رفرانس‌ویروس(لندن)	۱۳۴۸/ ۶/۲۵
Vero	» » » »	۱۳۴۸/ ۶/۲۵
RK_{13}	» » » »	۱۳۴۸/ ۶/۲۵

همه رده‌های سلولی نامبرده در محیطی که منبع اسیدهای آمینه آن هیدرولیزای کازئین میباشد[۱۳] و در خودآزمایشگاه تهیه میگردد کشت و نگهداری میشوند.

خلاصه

علم ویروس شناسی پیشرفت سریع خودرا به کشت سلول مدیون است که از سال ۱۹۵۲ ببعد متداول شده است . بدون اغراق میتوان گفت که استفاده ازکشت سلول تحولی شگرف و انقلابی پرثمر در ویرولوژی بوجود آورد . کشت سلول نه تنها به تهیه واکسن برضد تعدادی از بیماریهای ویروسی انسان وجانوران تحقق بخشید بلکه شناسائی ویروسهای جدیدی را نیز سبب گردید وبه‌کشفیات با ارزش بیشماری‌امکان داد. درویروس شناسی‌امروزه دو نوع کشت سلول مورد استفاده قرار میگیرد که عبارتند از کشتهای نخستین سلول وکشتهای رده پیوسته .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

در حال‌حاضر شش رده سلولی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران نگهداری و مورد استفاده قرار میگیرند که عبارتند از رده‌های سلولی

RK_{13} ،Vero ،Am_{57} ،HeP_2 ،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

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]