

STUDIE VIRU SPALNIČEK NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH Z OPIČÍCH LEDVIN

1. Izolace viru z 5 pacientů se spalničkami.

Autoři:

VIGGO BECH a PREBEN VON MAGNUS

Obdrženo 20. 6. 1957

V roce 1954 *Enders & Peebles* (6) ohlásili úspěšnou izolaci agens podobného viru z krve a kloktáním z hrtanu pacientů se spalničkami. Tato agens se množila v kulturách z lidských a opičích ledvinových buněk a produkovala charakteristické cytopatické změny. Bylo zjištěno, že živný roztok z infikovaných kultur obsahoval antigen, který vázal komplement v přítomnosti rekonvalescentního spalničkového séra. Kromě tohoto séra bylo prokázáno, že inhibuje šíření izolovaného agens v tkáňových kulturách. Tato původní pozorování *Enderse a Peeblese* byla později potvrzena *Cohenem a kol.* (3). Tito výzkumníci izolovali několik virových kmenů a studovali intracelulární lokalizaci viru ve tkáňových kulturách pomocí techniky barvení protilátek fluorescenčním barvivem.

V nedávné době *Dekking a McCarthy* (4) ohlásili, že se jim podařilo vnést virus spalniček do kmene KB lidských nádorových buněk. Přibližně ve stejnou dobu *Black Reissig a Melnick* (2) uspěli v adaptaci viru spalniček u jiného kmene lidských nádorových buněk MX 2.

Tento příspěvek uvádí izolaci pěti kmenů viru spalniček v kulturách buněk opičích ledvin ošetřených trypsinem. Dále je popsána identifikace kmenů pomocí sérologických testů a přenos onemocnění na opice.

MATERIÁLY A METODY

Tkáňové kultury: Byly používány buňky ledvin opic druhu makak rhesus, makak jávský nebo pavián ošetřené trypsinem. Pro přípravu těchto tkáňových kultur byl použit postup podle *Youngera* (15) s určitými modifikacemi, jak již bylo popsáno (10). Během růstu byly buňky v růstovém prostředí s následujícím složením: hydrolyzát mléčného albuminu 0,5procentní (11) v *Hankově* roztoku (9) obsahujícím 2 procenta koňského séra.

Před infikováním virem bylo *médium* upraveno. Do každé ze zkumavek bylo přidáno 1,8 ml buď syntetického média 199 (12), nebo hovězí plodové vody (5) obsahující fenolovou červen jako indikátor (konečné zředění 0,02 procenta). Všechna média obsahovala penicilin (100 jednotek/ml) a streptomycin (0,1 mg/ml).

Odběr vzorků: Izolace viru byla prováděna kloktáním z hrtanu a z krve.

Kloktání z hrtanu: Pacienti se spalničkami byli požádáni, aby si vyklotali buď 15 ml směsi jednoho dílu živné půdy pro infúzi z volského srdce a 2 dílů pufrovaného fyziologického roztoku, nebo u později prováděných experimentů 111 ml destilované vody obsahující 1 procento Bacto tryptózy „Difco“. Do tekutiny byl přidán penicilin 100 jednotek na ml a streptomycin 0,1 mg na ml. Z hrtanů velmi *malých* dětí byly vzorky získány pomocí stěru vatovými tyčinkami, které byly následně ponořeny do 2 ml jedné ze dvou tekutin popsaných výše. Ve všech případech byly vzorky ihned zmrazeny v suchém ledu (CO₂-ice) a dále skladovány v elektrickém mrazáku (při teplotě –60 °C). Před naočkováním do tkáňové kultury byl materiál rychle rozmrazen pod tekoucí vodou o teplotě 37 °C.

Krev: u starších experimentů byl do krve přidán heparin (2 ml 0,05procentního roztoku heparinu na 10 ml krve). U pozdějších experimentů byla krev ponechána, aby zkoagulovala. Červené krvinky, které nebyly zachyceny ve sraženině, byly resuspendovány v séru a tato směs byla použita jako inokulum pro tkáňové kultury. Vzorky krve byly skladovány při teplotě +4 °C až do inokulace.

Inokulace tkáňových kultur: Tkáňové kultury byly inokulovány 0,5 ml materiálu získaného kloktáním nebo 0,25 ml krve. Konečné množství tekutiny ve zkumavkách bylo přibližně 2 ml. Kultury byly uchovávány buď ve *stabilním* stavu, nebo byly umístěny do otáčivého bubnu (1 otáčka za minutu).

Subkultury z první pasáže byly vytvořeny v rozmezí od 6. do 16. dne, obvykle 8. den po inokulaci. Živné médium nebylo během pasáže zpravidla měněno. Subkultury z pozdějších *pasáží* byly vytvořeny v rozmezí od 6. do 12. dne inkubace. Pasáž materiálu obsahovala suspenzi buněk a buněčné drti v kultivačním médiu. Tato směs byla získána uvolněním buněk dosud ulpívajících na skle seškrabáním pipetou. Naočkované množství se lišilo, ale obvykle bylo 0,2 ml, takže konečný objem tekutiny v inokulovaných zkumavkách byl přibližně 2 ml. Sériové pasáže materiálu z kontrolních zkumavek byly prováděny stejným způsobem.

Komplement fixační testy: Komplement fixační testy byly provedeny způsobem podle *Fultona a Dumbella* (8) v úpravě podle *Svedmyra, Enderse a Hollowaye* (14). Jako antigen byla použita nezředěná suspenze buněk a buněčné drti z různých pasáží, a to buď hned po sklizni, nebo po kratší či delší době skladování při teplotě –20 °C. Součástí *každého* z experimentů byly kontrolní vzorky s antigenem sestávajícím z kultivačních tekutin obsahujících buňky z nenaočkových tkáňových kultur. Všechny antigeny byly deaktivovány při teplotě 56 °C.

Antisérum obsahovalo sloučený vzorek od přibližně 10 pacientů se spalničkami smíchaný 2–4 týdny po výskytu vyrážky. Sérum bylo deaktivováno zvýšením teploty na 56 °C na půl hodiny.

VÝSLEDKY

Izolace viru.

Na jaře 1955 a v průběhu roku 1956 byly provedeny experimenty s izolací u 13 pacientů s klinickými příznaky spalniček (Tabulka 1).

Materiál od 9 pacientů byl odebrán během prvních 24 hodin po propuknutí vyrážky. Virus byl získán z hrtanu pěti z těchto pacientů, ve 2 případech pomocí stěrů vatovou tyčinkou (čísla 1 a 11) a ve dvou případech kloktáním (čísla 4 a 10). Od jednoho pacienta (číslo 6) byl virus získán jak ze stěru vatovou tyčinkou, tak kloktáním.

Vzorky získané kloktáním byly před naočkováním na tkáňové kultury uchovávány ve zmrazeném stavu při teplotě –60 °C po různě dlouhou dobu. Jak je vidět v tabulce 1, virus bylo možné získat i po uplynutí 4 dnů před očkováním (pacient číslo 5).

Virus byl izolován z heparinizované krve pouze v jednom ze tří pokusů

TABULKA 1

Izolace viru spalniček v tkáňových kulturách z opičích ledvin.

Virus byl získán od 5 ze 13 pacientů.

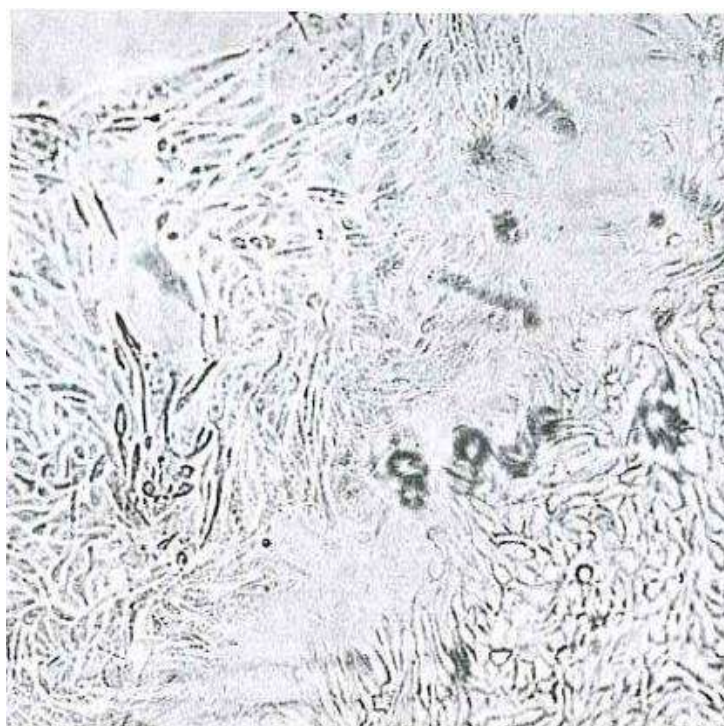
Patient				Isolation material		Virus recovered from		
No.	Sex	Age years	Date of specimen	Collected hours after onset of rash	Stored (-60°C) hours before inoculation	Throat swab	Throat gargling	Blood
			1955					
1	M.	6	April	24	48	+	—	0*
2	M.	2	April	18	2	0	—	0*
3	F.	1	May	30	2	0	—	—
4	M.	7	May	18	2	—	+	+*
			1956					
5	M.	21	Jan.	24	1	+	—	0
					24	—	+	0
					96	—	+	—
6	M.	25	Jan.	40	2	—	0	0
7	M.	5	Jan.	<12	14	0	—	—
8	M.	7	Jan.	>24	14	0	—	—
9	F.	8	Feb.	8	16	0	—	0
10	F.	13	Feb.	13	48	0	+	0
11	F.	6	Feb.	6	19	+	—	0
12	M.	9	Feb.	6	19	—	0	0
13	F.	13	May	>24	19	—	0	0

+ = virus izolován.

-- znamená: neprovedeno.

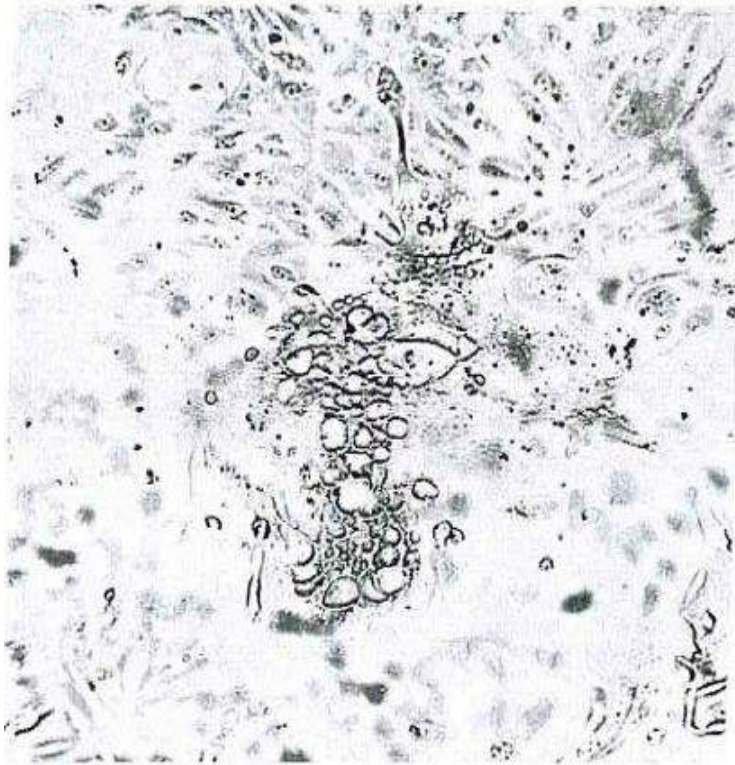
() = virus nebyl získán.

*heparinizovaná krev.

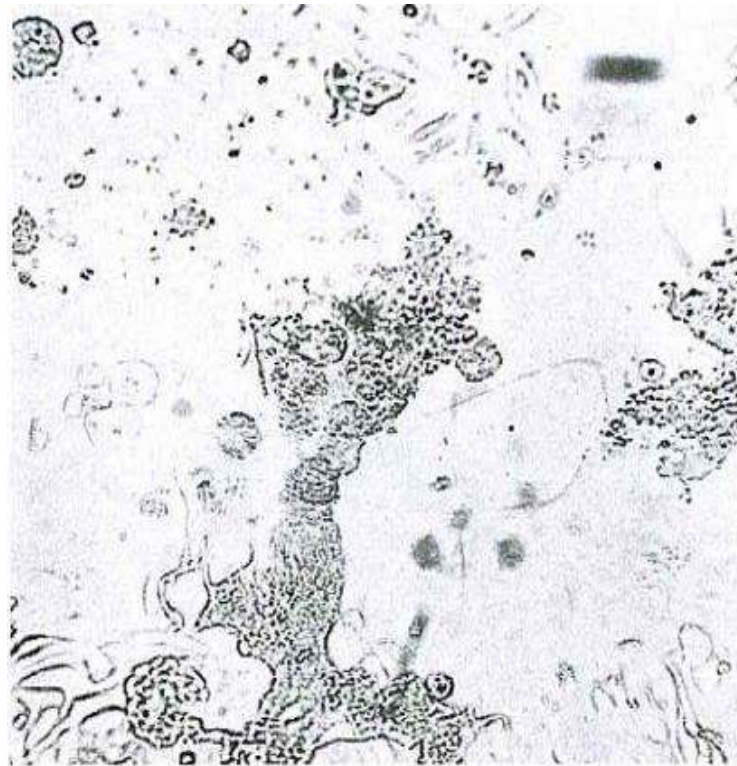


Obr. 1

Růst normálních epitelových buněk v nenačkované tkáňové kultuře z opičích ledvin

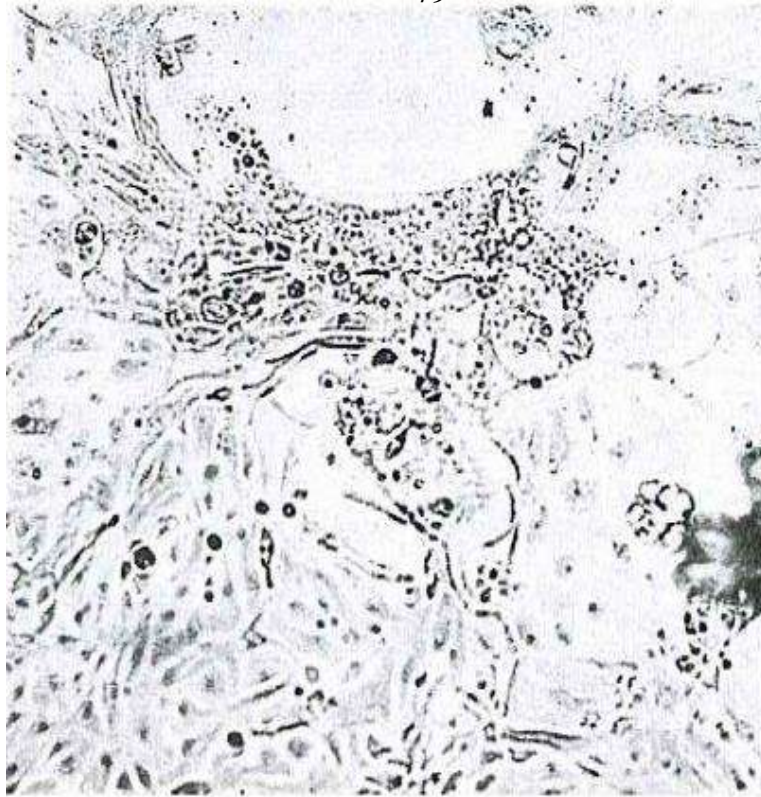


Obr. 2

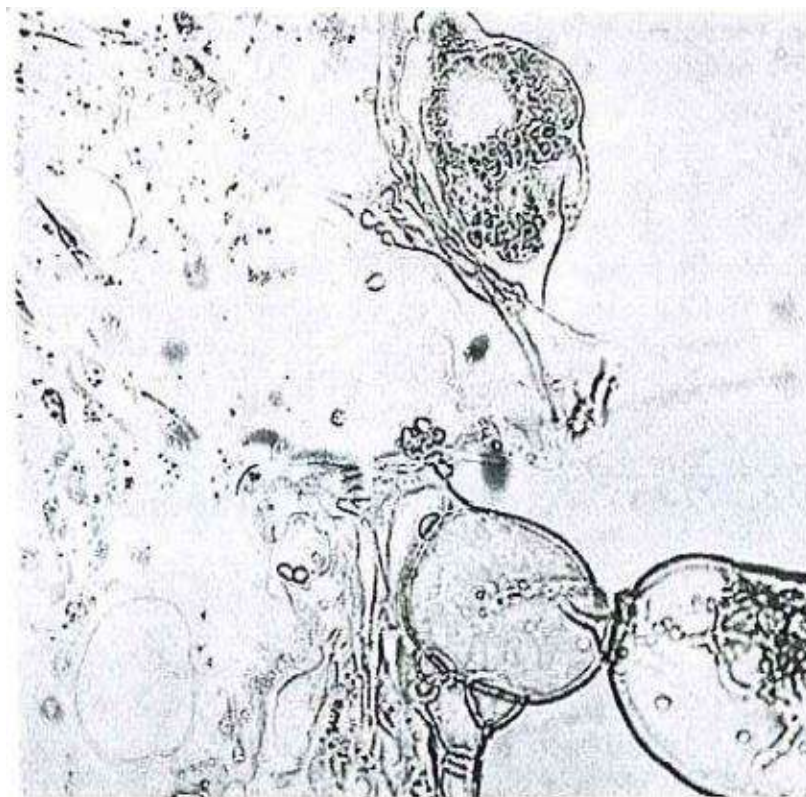


Obr. 3

Obr. 2 a 3. Projevy cytopatie u tkáňových kultur z opičích ledvin naočkovaných virem spalniček. Obr. 2 Syncytium s vakuolami. Obr. 3. Pozdější stadium vykazující charakteristickou buněčnou drť; s kruhovými útvary.



Obr. 4



Obr. 5

Obr. 4 a 5 Nenaočkované tkáňové kultury z opičích ledvin vykazující syncytiální vakuolované struktury připomínající struktury způsobené virem spalniček (Obr. 4) a poněkud jiné velikosti a vzhledu (Obr. 5).

pokusů (číslo 4) a v žádném případě ze séra (v žádném odebraném od 5 pacientů smíchaném do 24 hodin po vypuknutí vyrážky).

U 4 pacientů byl pokus o izolaci viru proveden po uplynutí více než 24 hodin po vypuknutí exantému. Izolace viru od žádného z těchto pacientů nebyla úspěšná.

Cytopatické změny: Cytopatické změny pozorované v kulturách určených pro izolaci viru spalniček byly podobné změnám popsaným *Endersem a Peeblesem (6)*: Po uplynutí jednoho až několika dnů se ve tkáni vytvořily plochy podobné syncytiu. Zpočátku tyto změny dominovaly na okraji tkáně. Zdá se, že syncytia vznikají splnutím buněk, jejichž membrány postupně mizí. Během další inkubace se syncytia zvětšovala a na dalších místech vznikala nová. Velmi brzy se v centrální části postižených oblastí vytvořily velké počty malých vakuol, ze kterých vznikly pěnové nebo krajce podobné útvary (Obr. 2).

S postupující degenerací vakuoly mizí a změněné oblasti nyní vypadají stejnoměrně hrbolaté a tmavěji než okolní buňky. Buněčná drť se může uvolnit ze skla a plavat v kultivačním médiu, takže v tkáňovém médiu zůstane místo bez tkáně. Obvykle se však zbytek zničené tkáně uspořádá ve formě tmavého ohraničení zbývající tkáně.

V tento okamžik se v kulturách objeví dosti velké útvary, více či méně kruhového tvaru obrysu a vyznačující se buď docela hladkým, nebo vroubkovaným okrajem (Obr. 3). Tyto útvary jsou pravděpodobně výsledky kondenzace buněčné drti z jednotlivých degenerovaných oblastí. Vyskytují se bez ohledu na to, zda byla kultura stacionární nebo rotující. Mohou být fixovány k normální tkáni, ale často plavou v kultivačním médiu.

Destrukce tkáně pokračuje, protože jednotlivá syncytia se zvětšují a objevují se nová. Ve tkáni z opičích ledvin se rychlost destrukce a rozsah cytopatických změn může značně lišit mezi jednotlivými pasážemi. Občas zůstanou větší nebo menší plochy normální tkáně i po dobu 2 až 3 týdnů. Většinou však zbývající tkáň vykazuje ztrátu struktury a granulaci buněk. Tuto obecnou celkovou degeneraci tkáně lze příležitostně pozorovat již po několika dnech inkubace.

Jak popsali *Enders a Peebles (6)* a později *Rustigian a kol. (13)* a *Cohen a kol. (3)*, cytopatické změny podobné změnám způsobeným virem spalniček lze pozorovat také v naočkovaných kulturách tkáně z opičích ledvin (Obr. 4–5). Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny agens podobnými viru, tzv. pěnovými agens, která se pravděpodobně vyskytují v buňkách ledvin u zjevně zdravých opic. Antigen specifický pro spalničky je však produkován pouze v kulturách infikovaných virem spalniček. V této studii byla proto využita schopnost pasážovaného materiálu tkáňové kultury vázat komplement v přítomnosti séra spalniček z rekonvalescentní

fáze jako kritérium přítomnosti viru spalniček.

Sérologické studie.

Komplement fixační testy: Tabulka 2 uvádí výsledky komplement fixačních testů na séru od čtyř pacientů se spalničkami. Krev byla odebrána, jakmile to bylo možné po výsevu vyrážky, a poté v rozmezí od 9. do 37. dne během rekonvalescence.

TABULKA 2

Komplement fixační titry séra získaného od případů spalniček.

Patient no.	Serum drawn (days after rash)	Complement fixation titer		
		Antigen † V-3	Antigen V-14	Antigen XI-5
5	1	< 8*	—	—
	18	> 32	—	—
9	< 1	< 8	—	—
	9	256	—	—
13	> 1	—	32	32
	17	—	256	256
G.	< 1	—	< 8	< 8
	5	—	128	128
	37	—	256	256

† Použité antigeny byly připraveny z tkáňových kultur z ledvin opic infikovaných spalničkami: V-3 a V14 = 3. resp. 14. pasáž agens z pacienta V, XI-5 = 5. pasáž agens z pacienta XI.

* Titry vyjádřené jako převrácená hodnota zředění séra

— Znamená: neprovedeno.

Experimenty s infikováním opic makak rhesus

K experimentům s infikováním byly použity dvě opice makak rhesus narozené v institutu, přibližného stáří jeden rok. Před očkováním byla séra obou zvířat vyšetřena na přítomnost přirozeně získaných protilátek proti spalničkám. Žádné takové protilátky se nepodařilo prokázat. Obě opice byly očkovány intranazálně a perorálně pasáží materiálu virového kmene izolovaného z pacienta číslo 11. U tohoto kmene bylo zjištěno, že produkuje uniformní cytoplazmatické změny v rámci všech pasáží a komplement fixační antigen viru spalniček byl přítomen ve všech subkulturách.

Během následujícího měsíce byly opice pečlivě pozorovány a každý den jim byla měřena teplota. Jedenáctého dne po očkování jedno ze zvířat vykazovalo všeobecnou vyrážku na hlavě, která se později rozšířila po těle a končetinách. Vyrážka podobná vyrážce, která se vyskytuje u lidských pacientů se spalničkami, trvala pouze 24 hodin. Teplota opic se pohybovala v rozmezí normální teploty. Vzorky krve odebrané den poté, kdy zmizel exantém

(13. den), vykazovaly titer $< 1 : 8$ v komplement fixačních testech, zatímco krev odebraná o 8 dnů později měla titer $1 : 256$. Tato opice byla naočkována materiálem z 21. pasáže viru spalniček. Antigen použitý při komplement fixačních testech byl připraven z 5. pasáže kmene viru použitého pro očkování opic.

Druhá z opic, která byla naočkována materiálem z 9. pasáže téhož kmene spalniček, nevykazovala během doby jednoho měsíce žádné symptomy. V rámci komplement fixačních testů však bylo možné prokázat zvýšení titru séra z $< 1 : 8$ na $1 : 256$ ve vzorcích krve odebraných v době očkování, resp. o 17 dnů později. Použitý antigen byl stejný jako antigen uvedený výše. Sérum od obou opic bylo později opakovaně testováno pomocí antigenu připraveného ze 14. pasáže tkáňové kultury kmene viru získaného od pacienta číslo 5. *Titry séra byly identické s těmi, které byly získány v přítomnosti homologních antigenů.*

DISKUZE

Předkládaná práce potvrzuje zjištění *Enderse a Peeblese* (6) a *Cohena a kol.* (3), že tekutina použitá ke kloktání a krev pacientů v raném stadiu spalniček obsahuje virus, který je schopen produkovat charakteristické cytopatické změny v kulturách lidských a opičích ledvinových buněk. V naočkovaných kulturách byly pozorovány stejné syncytiální útvary, jako útvary popsané *Endersem a Peeblesem* (6). Dále bylo zjištěno, že v systému tkáňových kultur použitých v této laboratoři vznikly během pokračující inkubace další specifické léze. Tento druhý krok degenerace měl za následek akumulaci buněčné drti s kruhovými, jakoby hrbolatými útvary, které měly buď docela hladký, nebo zvrásněný okraj. Zdá se, že tyto cytopatické změny jsou stejně specifické pro virus spalniček jako syncytia.

Viry z opičích ledvin neboli „pěnová agens“ však mohou vést k buněčným degeneracím, které jsou mikroskopicky nerozlišitelné od degenerací způsobených virem spalniček. Z tohoto důvodu mají cytologické projevy omezenou hodnotu v rámci studie spalniček a jsou požadována další kritéria pro stanovení identity pěstovaných agens. Tohoto cíle lze dosáhnout prokázáním intranukleárních inkluzních tělísek v infikovaných buněčných kulturách (6) nebo pomocí testů na přítomnost antigenu viru spalniček buď pomocí metody nepřímé fluorescenční reakce (3), nebo komplement fixační reakcí (3,6). Z důvodu jednoduchosti posledně jmenované metody byla v této studii použita tato metoda. Pozorování vývoje antigenu spalničkového viru v různých kulturách bude popsáno podrobněji v další publikaci (1).

Ve studii předkládané v tomto článku byl virus spalniček izolován z pěti z celkem devíti vzorků tekutin použitých ke kloktání odebraných do 24 hodin od výsevu exantému. Důvodem, proč izolace u jednoho pacienta

(číslo 1) selhala, může být skutečnost, že těsně před kloktáním zvracel. Ve zbývajících třech případech (čísla 2, 7 a 9) nebylo k dispozici žádné zřejmé vysvětlení negativních výsledků. Možná byla důvodem skutečnost, že tyto izolace pocházely ze stěrů hrtanu vatovou tyčinkou u malých dětí, které byly velmi rozrušené, a bylo tedy obtížné vzorek odebrat.

Virus byl získán z krve pouze v jednom z osmi pokusů provedených do 24 hodin od výsevu vyrážky. Tato míra izolace byla nízká v porovnání s výsledky získanými *Endersem a Peeblesem* (6), kteří získali virus z krve čtyř z pěti pacientů. Tito autoři použili heparinovanou krev, z níž mohlo být snazší získat virus než ze séra obsahujícího resuspendované krvinky. V naší laboratoři byla jediná izolace z krve provedena z jednoho ze tří vzorků, k nimž byl přidán heparin. Enders a Peebles také použili větší inokulum (0,5 ml až 2 ml), než které bylo použito v této studii (0,25 ml).

Byla zvažována možnost, že neúspěšný pokus izolovat virus u 8 ze 13 vyšetřovaných pacientů mohl být důsledkem odolnosti konkrétních použitých buněk vůči viru spalniček. Zjevně to však není tento případ, neboť zkumavky připravované současně se zkumavkami použitými při neúspěšných izolačních experimentech byly očkovány virem spalniček, který infikoval tekutinu typickými cytopatickými změnami, k nimž došlo společně s výskytem komplement fixačního antigenu v živném médiu.

Pozorování uvedená v tomto článku se shodují s předpokladem, že izolovaná agens jsou příčinou spalniček. Především bylo získáno 5 kmenů virů z hrtanu nebo krve pacientů v časně akutní fázi infekce spalničkami. Všechny pokusy izolovat virus později než 24 hodin od výsevu vyrážky selhaly. K nespornému nárůstu komplement fixačních protilátek proti izolovaným agens došlo během rekonvalescence u všech vyšetřovaných pacientů. Další důkaz, že izolovaná agens jsou odpovědná za spalničky, byl získán přenosem onemocnění na opici makak rhesus podáním viru z tkáňové kultury. U jednoho z těchto zvířat došlo k vyrážce podobné vyrážce, kterou vyvolávají spalničky, a to 11. den po očkování, což je časový interval, který je v souladu s vývojem onemocnění u člověka. Zajímavé je, že tato opice byla očkována 21. pasáží tkáňové kultury, kdežto druhé opici, která nevykazovala žádné klinické příznaky, byl podán materiál tkáňové kultury 9. pasáže téhož kmene. Nebyl tedy zjištěn žádný důkaz, že u opic došlo k oslabení viru při prodloužení pasáže ve tkáňové kultuře. Nebylo ani možné, aby odlišná odpověď zvířat byla připisována již dříve získané imunitě vůči spalničkám. Obě zvířata se narodila v tomto institutu a ani jedno z nich nemělo před očkováním protilátky proti spalničkám. Obě reagovala na infekci výrazným zvýšením komplement fixačních protilátek.

Výsledky experimentů s přenosem se shodují s výsledky získanými *Endersem (7)* a *Blackem, Reissigem a Melnickem (2)*. Tito výzkumníci však zavedli virus intravenózně nebo intramuskulárními injekcemi, v experimentech popsanych v tomto článku byla ale použita „přirozená“ cesta infekce.

V souvislosti s vyšetřováním akutní a konvalescentní fáze séra od pacientů se spalničkami je třeba uvést, že pacient G. (Tabulka 2) byl jedním z několika obyvatel Grónska, kteří byli infikováni během velké epidemie spalniček, k níž došlo v září až říjnu 1956 ve velké komunitě v Grónsku. Několik dalších spárovaných vzorků séra od pacientů se spalničkami bylo testováno proti antigenu spalniček připravenému z virových kmenů izolovaných od sporadických případů v Kodani. Ve všech testech bylo možné prokázat jasný nárůst protilátek (nepublikovaná data). Toto pozorování dokládá také příčinný vztah mezi izolovanými agens a spalničkami.

SHRNUTÍ

(1) Virus byl izolován ve tkáňových kulturách opičích ledvin ošetřených trypsinem z tekutiny získané kloktáním a z krve od 5 ze 13 pacientů vyšetřovaných během akutní fáze spalniček. Ve všech případech byl *virus* izolován z tekutiny získané kloktáním nebo ze stěru hrtanu vatovými tyčinkami a pouze jeden kmen byl získán z krve. Všechny pokusy izolovat virus později než 24 hodin od výsevu vyrážky selhaly.

(2) Jsou popsány cytopatické projevy pozorované u tkáňových kultur infikovaných virem spalniček i v nenaočkovaných kontrolních zkumavkách. Komplement fixační testy na přítomnost antigenu viru spalniček byly použity jako kritérium pro stanovení přítomnosti tohoto viru v infikovaných kulturách.

(3) Intranazální a perorální podání materiálu z pozdní pasáže jednoho z izolovaných agens dvěma opicím druhu makak rhesus mělo za následek výsev vyrážky podobné vyrážce při onemocnění spalničkami u jednoho ze zvířat, přičemž obě opice si vytvořily protilátky proti naočkovanému kmenu.

(4) V sérologických studiích akutní a konvalescentní fáze séra od pacientů se spalničkami pomocí tkáňových kultur z opičích ledvin infikovaných virem spalniček jako antigenu v rámci komplement fixačních testů byl pozorován jasný nárůst protilátek ve všech případech.

REFERENCES

1. *Bech, Viggo*: Studies on Measles Virus in Monkey Kidney Tissue Cultures. 2. Development of Cytopathic Changes and Identification of the Cultivated Agents by Complement Fixation Tests, Acta path. et microbiol. Scandinav. 42: 86-96, 1958.
2. *Black, Francis L., Magdalena Reissig and Joseph L. Melnick*: Propagation of Measles Virus in a Strain of Human Epidermoid Cancer Cells (HeP-2). Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 93:107108.1956.
3. *Cohen, Sophia M., Irving Gordon, Fred Rapp, John C. AtocAulafif it Buckle!*. ..*Sonja M.*: Fluorescent Antibody and Complement Fixation Tests of Agents Isolated in Tissue Culture from Measles Patients, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 90: 118-122,1955.

4. Dekking, Fritz and Kevin McCarthll: Propagation of Measles Virus in Human Carcinoma Cells, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 93: 1-2,1956.
5. Enders, John F.: Bovine Amniotic Fluid as Tissue Culture Medium in Cultivation of Poliomyelitis and Other Viruses, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 82: 100105,1953.
6. Enders, John F. & PeebteN, T. C.: Propagation in Tissue Cultures of Cytopathogenic Agents from Patients with Measles, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 86: 277-286,1954.
7. Enders, John le; Observations on Certain Viruses Causing Exanthematous Diseases in Man, Am. J. hied. Se. 231: 622-637,1956.
8. Fulton, F. litimbell, K. R.: The Serological Comparison of Strains of Influenza Virus, J. (Tien. Microbiol_ 3 97-111,1949.
9. tionlcs, J. 11. & Wallace, R. E.: Relation of Oxygen and Temperature in the Preservation of Tissues by Refrigeration, Proc. Sou. Exper. Biol. & Med. 7/; 196-200,1949.
10. von Magnus, Preben,lcum Petersen, K., Beek V., Petersen, I. & von Magnus, Tissue Cultures of Trypsinized Kidney Cells from Different Monkey Spices, Dan. hied. Bull. 2: 236-240,1955.
11. jilelniek, Joseph L. & leiordctn, J. T.: Poliomyelitis Viruses In Tissue Culture. 4. Protein-Free Nutrient Media in Stationary and Holler Tube Cultures, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 81: 208-213,1952.
12. Morgan, I. P.₂ Morton, it Parker, .R. C.: Nutrition of Animal Cells in Tissue Culture. I. Initial Studies on a Synthetic Medium, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 73:1-8,1950.
13. Rustiffon, Robert, Johnston, Paul Sc Reihart, Helen: Infection of Monkey Kidney Tissue Cultures with Virus-Like Agents, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 88: 8-•16 1955.
14. St.tedmur, A., Enders, J. F. & Hollowly, A.: Complement Fixation with Brunhilde and Lansing Poliomyelitis Viruses Propagated in Tissue Culture, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 79: 296300,1952.
- 15, Youngner, I. S.: Monolayer Tissue Cultures. I. Preparation and Statidardization of Suspensions of Trypsin-Dispersed Monkey Kidney Cells. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 85: 202-205,1954.