

MDBK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE IBR VİRUSUNUN MORFOLOJİSİNİN
ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELENMESİ

Feray Alkan¹ İbrahim Burgu²

Electron microscopic investigation of IBR virus in MDBK cell cultures.

Summary: *Morfology of IBR viral particles was investigated in thin section of MDBK cells. Viral particles being in different replication stages were seen in nucleus and cytoplasm. Virus particles in nucleus were approximately 80-90 nm in diameter and generally characterized by a central electron dense core and a surrounding capsid of similar electron density. Some of viral particles had an electron density. Some of viral particles had an electron - dense and homogeneous core while others consisted of empty capsids. On the other hand, IBR viral particles found in cytoplasm were generally enveloped and measured about 150-160 nm in diameter.*

It is detected that nucleocapsids formed in nucleus were enveloped when the particle passing through the nuclear membranes into the cytoplasm. The cytoplasmic membranes have been seemed having a similar role together with nuclear membran in the envelopment process of nucleocapsid. It was also noted that nuclear membran self-enlarged and reduplicated in some slides.

When the results of this research is compared to those of obtained from similar studies, it is concluded that all herpesviruses have the same structural components, depending upon the replication stage.

Özet: *IBR virusunun morfolojisi, enfekte hücre kültürlerinin ince kesitlerinde incelendi. Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında değişik replikasyon aşamasında bulunan virus partikülleri görüldü. Hücre çekirdeğinde bulunan virus partiküllerinin yaklaşık 80-90 nm çapa sahip, genellikle merkezi yoğun bir kısım (dense core) ve onu çevreleyen benzer elektron yoğunluğa sahip kapsit ile sarılı olduğu tesbit edildi. Bazı virus partiküllerinde merkezi çekirdek yoktu ve partiküller "boş" görülmüyordu. Bazı partiküller ise tamamen "dolu" görünüm-*

1 Yrd. Doç. Dr., AÜ. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

2 Prof. Dr., AÜ. Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

deydi. Hücre stoplazmasında bulunan virus partikülleri ise genellikle zarlı ve yaklaşık 150-160 nm çapa sahipti.

Hücrenin çekirdeğinde oluşan nükleokapsitin hücre çekirdek membranını geçerken zarlandığı saptandı. Nükleokapsitin zarlanması çekirdek membranı yanında sitoplazmik zarlanmanın da rol oynadığı belirlendi. Çekirdek zarının genişleyerek üstüste paketlenmiş olduğu görüldü (Reduplikasyon).

Bu araştırma sonuçları herpesvirusların morfolojileriyle ilgili diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında, herpesviruslar grubu içinde bulunan tüm virüslerde, replikasyonun aşamalarına bağlı olarak aynı yapısal gelişmelerin olduğu görüldü.

Giriş

Sığırların IBR virusu, herpesviridae familyasının alphaherpes viruslar alt grubunda bulunmakta olup, herpesvirusların genel özelliklerini taşımaktadır (6,9).

Herpesvirus virionları yaklaşık 150 nm çapında ve zarlıdır. Lipoprotein yapısındaki zar, yaklaşık 8 nm uzunluğunda peplomerlere sahiptir. Zarın yapısına bağlı olarak virus bazen pleomorfik görülebilir ve çapı 120-200 nm arasında değişir (6).

Herpesviruslar çift iplikçilikli DNA içerirler. Bu sebeple virus replikasyonu hücrenin çekirdeğinde gerçekleşir. Hücreye giren bir virus partikülünden uygun virusların oluşumuna dek, bir dizi kimyasal ve morfolojik değişiklikler oluşmaktadır. Herpesviruslar zar üzerinde bulunur. peplomerleri ile hücre reseptörlerine adsorbe olarak, hücrenin fagositik vakuolleri ya da virus zarının hücre zarına füzyonu yoluyla, hücrenin sitoplazmasına penetre olur. Daha sonra virus DNA'sı ve protein kompleksi serbest kalır ve virus DNA'sı hücrenin çekirdeğine girer. Hücre çekirdeği içinde, virus DNA'sı ile kapsit proteinlerinin sentezlenmesinden sonra, yeni sentezlenen DNA olgunlaşmamış kapsit proteinleri ile birleşir. Virusun olgunlaşması çekirdek zarlarından nükleokapsitin geçişi ile tamamlanır. Uygun virus daha sonra sitoplazmadaki vakuollere göç eder. Virusun hücre dışına çıkışı ise vakuolar membranların füzyonu ve exositozis ya da sitolizis ile olmaktadır. Herbir enfekte hücre yaklaşık olarak 10^5 virus partikülü üretmektedir (6).

Enfekte hücre kesitlerinde herpesvirusların morfolojileriyle ilgili araştırmalar nükleokapsitin hücre çekirdeğinde geliştiğini ortaya koy-

muştur. Çekirdekte bulunan partiküller genellikle dense core ile onu çevreleyen benzer elektron yoğunluğa sahip kapsitten oluşmuştur. Bazı partiküller ise dense core içermez ve "boş" görünümde iken, bazıları tamamen "dolu" görünüme sahiptir (1,3,5,13,20,23,24,25). Hücre çekirdeğindeki virus partikülü sayısı ile partiküllerin morfolojilerinin enfekte eden virusa ve enfekte edilen hücreye göre farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir(9). Watson ve ark. (25) ise partiküllerin morfolojilerinin tamamen kesite ilgili olduğunu ve boş bir nükleokapsitin ilerleyen kesitlerde dense core içerdiğini belirtmişlerdir.

Hücrenin sitoplazmasında, perinüklear aralıkta ve hücreler arasında bulunan virus partikülleri zarlı ve çekirdekte bulunan partiküllere oranla daha büyüktürler (3, 16,21). Gelişimini tamamlayan nükleokapsitin zarlanması çekirdek zarından sitoplazmaya geçişi sırasında olmaktadır (1,2,8,10,11,21). Önceleri zarlı viral partiküllerin sadece sitoplazmada görülmesi sebebiyle zarlanmanın sitoplazmada olduğu düşünülmüş ise de, perinüklear aralıkta zarlı virus partiküllerinin görülmesi ve çekirdek zarında reduplikasyonun saptanmasından sonra, herpesvirusların zarlanması çekirdek zarının rolü kesinleşmiştir(9). Herpesvirusların, çekirdek zarının yanısıra sitoplazmik elemanlardan da zarlandığı bildirilmiştir (8, 11,15,21)

Herpes viruslar grubu içinde yer alan virusların benzer büyüklüklerde olduğu saptanmıştır. Çekirdekte bulunan partiküllerin genellikle 40-50 nm çapında dense core içeren 90 nm çapında, sitoplazmada bulunan partiküllerin ise yaklaşık 120-150 nm çapında oldukları bildirilmiştir. (9).

Bu çalışmada, IBR virus ile enfekte MDBK hücrelerinin ince kesitlerinde virusun replikasyon aşamalarına bağlı olarak gösterdiği morfolojik değişimlerin incelenmesi ve elde edilen verilerin diğer herpes viruslar ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü: Araştırmada Madin darby bovine kidney (MDBK) hücre kültürü kullanıldı. Hücreler % 10 inaktive edilmiş dana serumu içeren Eagle MEM vasatı ile üretildi.

Virus: IBR virusunun referens suşu olan IBR Colorado suşu kullanıldı.

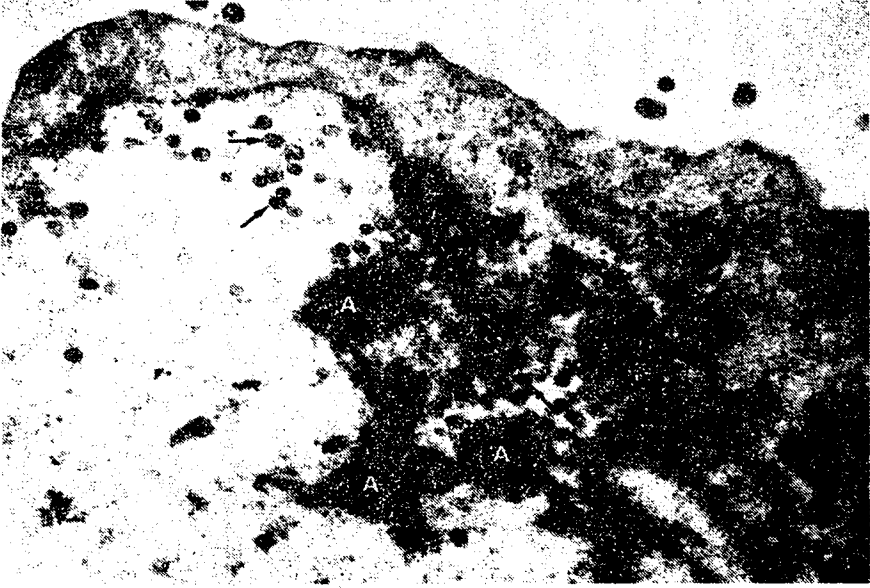
250 ml'lik hücre üretme şişelerinde üretilen hücreler, 1 ml IBR Colorado virusu ($10^{5.5}$ /ml) ile enfekte edildi. 1 saat adsorbsiyondan sonra, hücrelerin yüzeyleri PBS ile yıkandı ve hücre üretme şişelerine % 2 fetal dana serumu içeren Eagle MEM vasatı ilave edildi.

Elektron Mikroskopi: IBR Colorado virusu ile enfekte edilen hücre kültürlerinde % 20 sitopatolojik efekt oluştuktan sonra, hücreler tripsin enzimi ile hücre üretme şişesinden ayrılarak, santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dibe çöken hücreler pH: 7.2'de 0.1 M PBS içinde hazırlanan % 1'lik glutaraldehit ile 30 dakika tesbit edildikten sonra, tekrar 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildiler. Hücreler 30 dakika cacodylate tamponda bekletilerek, yeniden 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün dibinde kalan hücrelerin üzerine, 50°C dolayında erimiş % 2 'lik agardan 0.015 ml miktarında damlatılarak, tüp içeriği temiz bir lam üzerine döküldü. Agar lam üzerinde ince bir kitle halinde donduktan sonra küçük parçalar halinde (1.5-1 mm²) kesilerek, % 1 lik ozmik asitte tesbit edildi. Sürenin sonunda bu parçalar dereceli alkollerden geçirilerek Araldit M de bloka alındı. LKB Ultratome III ile bu bloklardan alınan ince kesitler, Reynolds(18) yöntemi ile boyandı ve Carl Zeiss EM 9 S-2 model elektron mikroskopta incelendi.

Bulgular

IBR Colorado ile enfekte edilmiş hücrelerin EM incelenmesinde hücrenin çekirdek ve sitoplazması ile hücreler arası ortamda bulunan virus partiküllerinin değişik yapısal gelişmeler gösterdiği belirlendi.

Enfekte hücrelerin çekirdeklerinde genellikle çok sayıda virus partikülü ile yer yer çekirdek zarına yakın olarak yerleşmiş kromatin adacıkları saptandı (Şekil 1). Bazı hücrelerde virus partikülleri hücre çekirdeği içinde dağılmış durumda iken, bazılarında çekirdek zarının iç yüzüne yakın dağılım gösterdikleri belirlendi. Virus partikülleri, bir merkezi dense core ve onu çevreleyen, benzer elektron yoğunluğa sahip kapsit ile karakterize olarak belirlendi. Kapsit ile dense core'un daha düşük elektron yoğunluğuna sahip bir boşluk ile ayrıldığı saptandı. Merkezi dense core oval yada yuvarlak görünümlü ve yaklaşık 35-40 nm çapa sahipti. Virus partiküllerinin çapı ise yaklaşık 80-90 nm olarak belirlendi. Bazı virus partiküllerinin içinde dense core yoktu ve virus "boş" görünümdeyken, bazılarının tamamen "dolu" görünümüne sahip olduğu saptandı (Şekil 2).



Şekil 1. MDBK hücresinde intranükleer agregatlar ve viral partiküller.

A: Intranükleer agregatlar, oklar: viral partiküller. X 28500.

Figure 1. Intranuclear aggregates in the nucleus of MDBK cell and some viral particles near this area.

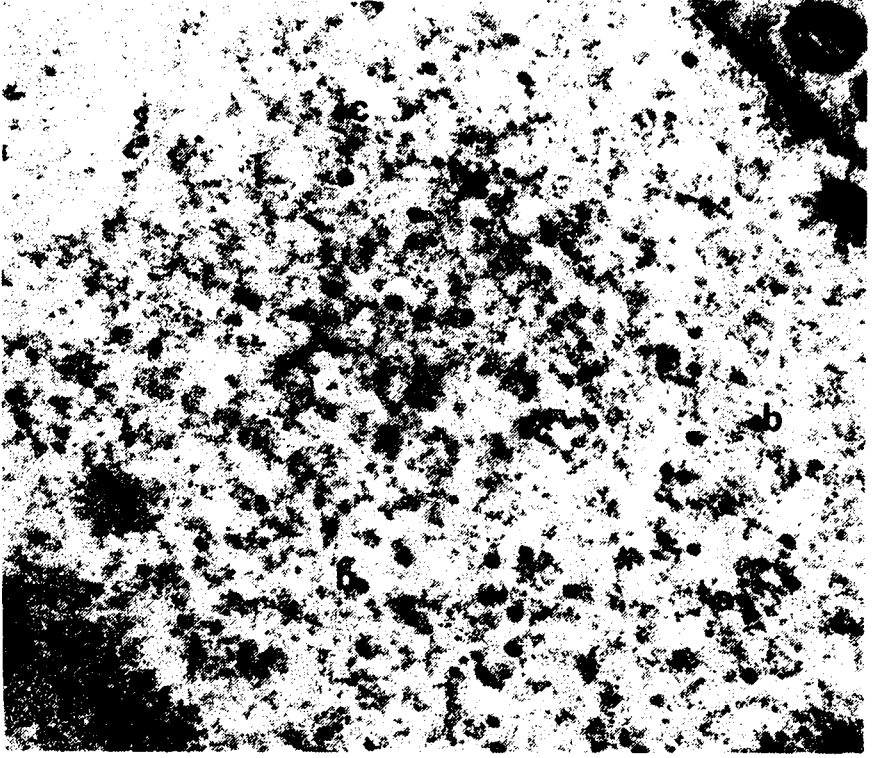
A: Intranuclear aggregates, arrows: viral particles. X 28500.

Hücresinin sitoplazmasında bulunan virus partikülleri ise genellikle zar ile sarılmış, yaklaşık 150-160 nm çaplı olarak belirlendi. Sitoplazmadaki virus partiküllerinin bazen bazen sitoplazmada dağınık halde, bazen de bir yada birkaçının endoplazmik kesecikler içinde bulunduğu saptandı (Şekil 3).

Perinükleer aralıkta zarlı virusların varlığı belirlendi (Şekil 4). Bazı hücrelerin çekirdek zarlarının genişleyerek, üst üste paketlenmiş görünüm aldığı ve bu sahaların yakınında genellikle çok sayıda viral partikülün bulunduğu görüldü (Şekil 5).

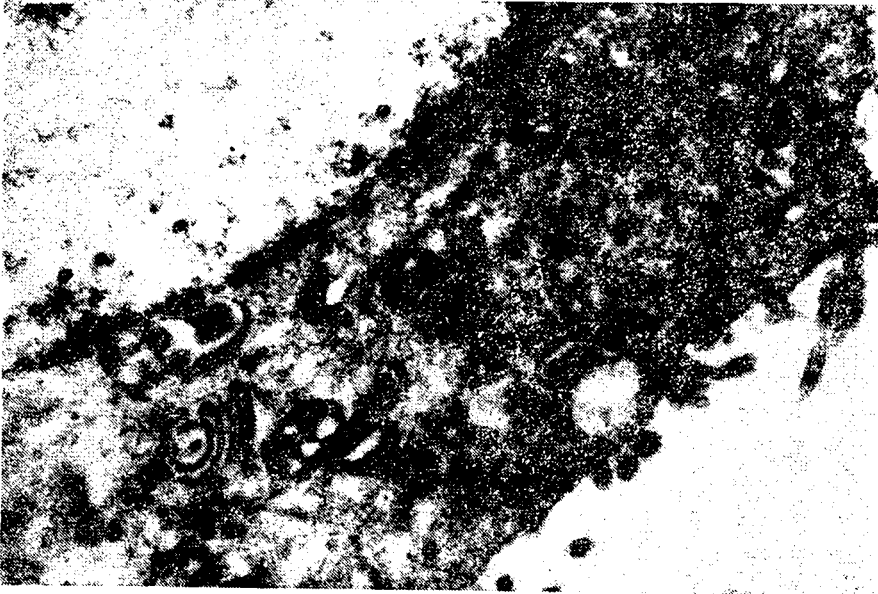
Bazı enfekte hücrelerin sitoplazmasında zarsız partiküllerin bulunduğu ve partiküllerin sitoplazmik veziküllerden zarlandığı saptandı (Şekil 6).

Hücreler arasında da çok sayıda virus partikülü görüldü. Bu partiküllerin zarlı ve yaklaşık 150-160 nm çapa sahip oldukları belirlendi (Şekil 7).



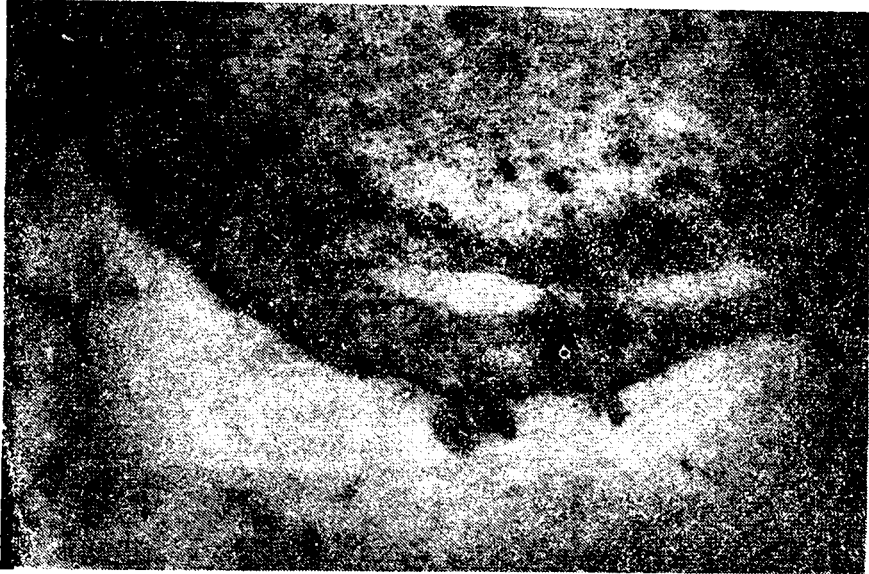
Şekil 2. Hücre çekirdeğinde nukleokapsitler a: dense core içeren kapsit, b: homojen elektron dense içerikli kapsit, c: "boş" kapsit X 19000.

Figure 2. Nucleokapsits in the nucleus a: capsids with visible core and halo, b: capsids with homogeneous electron dense contents, c: "empty" capsids. X 19000.



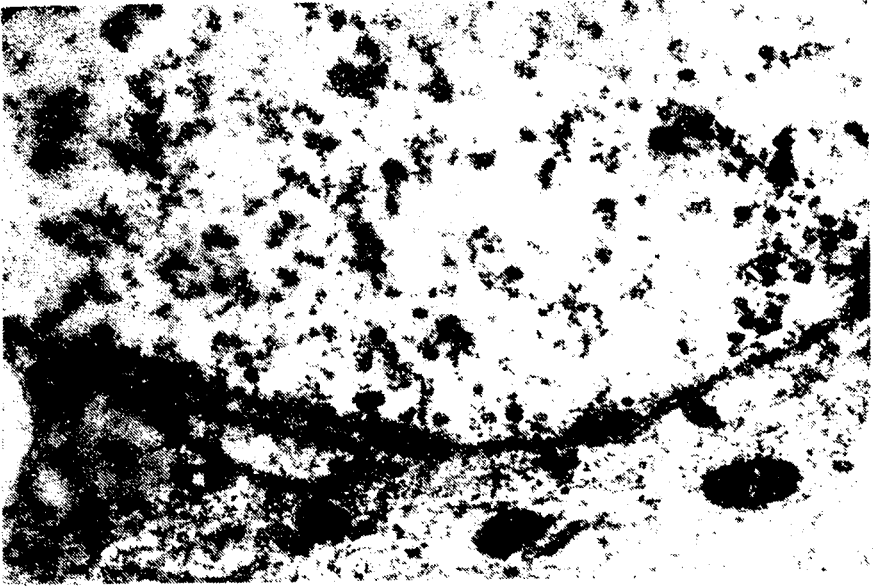
Şekil 3. Sitoplazmik vakuollerde zarlı viral partiküller (oklar) X 29450.

Figure 3. Enveloped viral particles within the cytoplasmic vacuoles (arrows). X 29450.

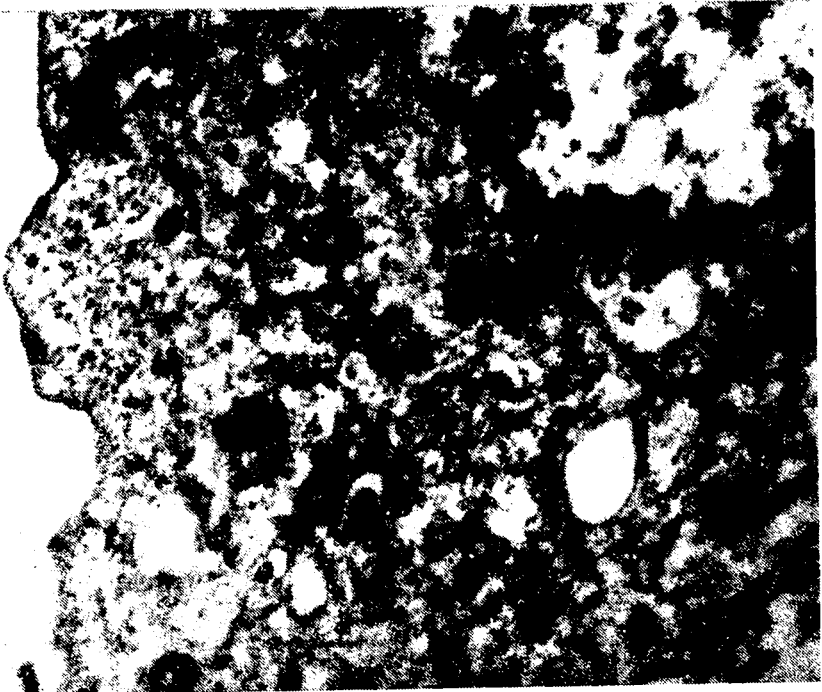


Şekil 4. Perinükleer aralıkta zarlı viral partiküller (oklar). X 33250.

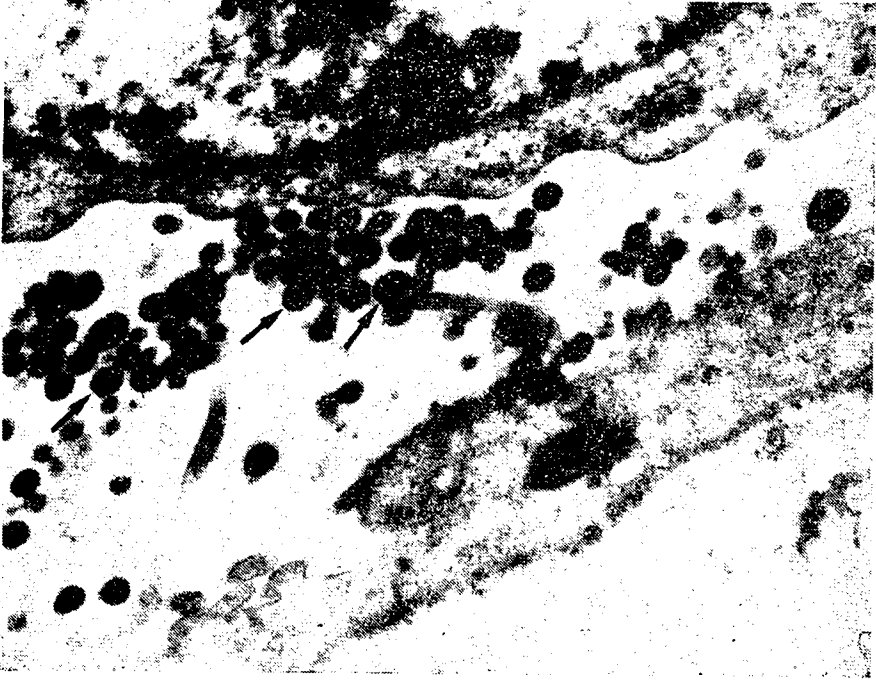
Figure 4. Enveloped viral particles into the perinuclear area (arrows). X 33250.



Şekil 5. Reduplike olmuş nuklear membranlar (oklar). X 32300.
Figure 5. Reduplicated nuclear membranes (arrows). X 32300.



Şekil 6. Viral partiküllerin sitoplazmik membranlardan zarlanması (oklar). X 20250.
Figure 6. Viral particles envelopment of cytoplasmic membranes (arrows). X 20250.



Şekil 7. Hücreler arasında zarlı viral partiküller (oklar) X 28500.

Figure 7. Enveloped viral particles in the extracellular area. (arrows) X 28500.

Tartışma

Enfekte hücrelerin ince kesitlerinin incelenmesiyle ilgili çalışmalar genellikle virusların morfolojilerinin araştırılması amacıyla yöneliktir. Ayrıca belirgin sitopatolojik efekt oluşturmada üreyen virusların neden olduğu enfeksiyonlar ile hücrelerde bulunan endojen virusların tesbiti amacıyla da bu yöntemden yararlanılmaktadır(7).

Bu araştırmada, IBR virusunun Colorado suşu ile enfekte edilen hücrelerin çekirdeklerinde genellikle zara yakın yerleşim gösteren agregatların varlığı saptandı. Lucké tümör explantlarında(22), Herpes simpleks ile enfekte insan ve hayvanların beyinlerinin kesitlerinde (3, 19, 24) yada herpes simplex virus ile enfekte edilen hücrelerde (11) ve IBR ile enfekte fetal dana böbrek hücre kesitlerinde (8) de benzer kromatin agregatların varlığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda agregatların enfeksiyonun ilk zamanlarında oluştuğu, enfeksiyondan

önce (3H) thymidine ile işaretlenmiş hücrelerin otoradyografik incelenmesinde bu yapıların DNA içerdiği ve aggregatların yeri virus partiküllerinin oluşumuyla ilgili yapılar olabileceği bildirilmiştir (9).

Hücrenin çekirdeğinde bulunan virus partikülleri 3 farklı yapı göstermiştir. Merkezi dense core ve onu çevreleyen benzer elektron yoğunluğa sahip kapsit, merkezi dense core içermeyen "boş" kapsit ve "dolu" görünen partiküller. IBR virusu ve herpesviruslar grubunda bulunan virusların morfolojilerine ilişkin araştırmalarda da saptanan bu farklı yapısal gelişmelerle ilgili değişik görüşler öne sürülmüştür. Bazı araştırmacılar enfekte eden virusa ve enfekte edilen hücreye bağlı olarak, hücrenin çekirdeğindeki virus partikülü sayısı ile partiküllerin morfolojilerinin farklılıklar gösterdiğini bildirirken(9), Watson ve ark (25) partiküllerin morfolojisinin tamamen kesite bağlı olduğunu, boş bir nükleokapsitin ilerleyen kesitlerde merkezi dense core içerdiğini bildirmişlerdir.

Hücre çekirdeğinin iç ve dış zarları arasında zarlı virus partiküllerinin saptanması, zarlı partiküllerin perinükleolar aralığın yanı sıra hücrelerin sitoplazmasında ve hücreler arasında da görülmesine karşın hücrenin çekirdeğinde rastlanmaması, IBR virusunun hücrenin çekirdeğinde başlayan gelişiminin, nükleokapsitin çekirdek zarını geçerken zarlanması ile tamamlandığını ortaya koymaktadır. Nitekim, Castro(2), Seo (21) ve Armstrong (1) da IBR virusunun gelişiminin hücre çekirdek zarından virusun geçişi ile tamamlandığını bildirmişlerdir. Jasty ve Chang (8) ise çekirdek zarı ile zarlanma yanı sıra, çekirdek zarını aşan partiküllerin sitoplazmada zarlandığını saptamışlardır. Bu araştırmada bazı enfekte hücrelerin sitoplazmasında zarsız partiküllerin bulunduğu ve partiküllerin sitoplazmik veziküllerden zarlandığı görüldü. Lecstma ve ark. (11) da HSV virusu ile enfekte edilen memeli sifir dokusu hücrelerinde, Pol ve ark. (15) aujeszky virusu ile enfekte nasal epitel hücrelerinde, Nii ve ark. (13) HSV ile enfekte edilen insan amrion hücrelerinde çekirdek zarı yanı sıra sitoplazmik zarlanmanın olduğunu saptamışlardır. Lecstma ve ark. (11) bu veziküllerin muhtemelen golgi aparatı yada ER keselerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Jasty ve Chang (8) IBR virusu ile enfekte edilen dana böbrek hücrelerinin çekirdek zarlarının reduplike olarak, birbiri üzerine paketlenmiş görünüm kazandığını ve bu membran yapıları arasında zarlı virus partiküllerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Jasty ve Chang(8)'ın bildirdiği gibi bazı hücrelerin çekirdek zarlarının reduplikasyonu saptanmıştır. Benzer

bulgular HSV, aujeszky, equin herpes virus ile enfekte hücrelerde (4), cytomegalovirus ile enfekte hücrelerde (14) ve lucké tümör explantlarında (22) da bildirilmiştir. Skinner ve Mizel (22) lucké tümör explantlarında, Darlington ve Moos (4) HSV ile enfekte BHV-1 hücrelerinin çekirdeklerinde keseler içinde zarlı virusların bulunduğunu, bu oluşumların muhtemelen hücrelerin iç zarının reduplikasyonu sonucu oluştuğunu ve çekirdek iç zarı ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Viral morfolojiyle ilgili çalışmalarda dikkati çeken önemli bir yapı intranükleer kristal form oluşumudur. Kristal yapı oluşumu lucké tümör explantlarında (22), HSV (13) ve canine herpes virus (16, 17) ile enfekte hücrelerde bildirilmiştir. Poste (16) ve Poste ve ark. (17) canine herpes virusu ile enfekte köpek böbrek hücrelerinin % 30'unda kristal yapı oluşumunu saptamışlardır. Araştırmacılar (17) ayrıca herpes viruslarda kristal yapı oluşumunun virusun in vitro pasaj sayısı ile ilişkili olduğunu, çok sayıda in vitro pasajlanan virusların kristal yapı oluşturmadığını belirtmişlerdir. Munz ve Goebel (12) ise izole edilen 4 herpesvirusun EM incelemesinde kristal yapı oluşumu görmediklerini ve incelenen virusların sadece 8-14. pasaj aşamasında olduğunu bildirmişlerdir. IBR virusu ile enfekte hücrelerde bugüne kadar kristal yapı oluşumu bildirilmemiş olup, bu çalışmada da enfekte hücrelerde kristal form görülmemiştir.

Bu araştırmanın sonuçları IBR virus ve diğer herpesvirusların morfolojileriyle ilgili araştırmalar ile karşılaştırıldığında, herpesviruslar grubu içinde bulunan tüm viruslarda replikasyon aşamalarına bağlı olarak benzer yapısal gelişmelerin olduğu görülmüştür.

Kaynaklar

1. **Armstrong, J.A., Pereira, H.G. and Andrewes, C.H.** (1961). *Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the herpesvirus group.* Virology 124: 276-285.
2. **Castro, J.M.** (1985). *Electron microscopic study of the cell infection cycle of infectious bovine rhinotracheitis virus* Annales del instituto nacional de investigaciones agrarias 2 (1): 155-166.
3. **Chou, S.M. and Cherry, J.D.** (1967). *Ultrastructure of cowdry type A inclusions. I. In human herpes simplex encephalitis.* Neurology 17: 575-586.

4. **Darlington, R.W. and Moss, L.H.** (1968). *Herpesvirus envelopment*. J. of Virol. 2 (1): 48-55.
5. **Dillard, S.H., Cheatham, W.J. and Moses, H.L.** (1972). *Electron microscopy of zosteriform herpes simplex infection in the mouse*. Laboratory Investigation, 26 (4): 391-402.
6. **Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J. and White, D.O.** (1987). *Herpesviridae*. In: Veterinary Virology Acad. Press. Londra
7. **Field, A.M.** (1982). *Diagnostic virology using electron microscopic techniques*. Adv. Virus Res. 27:1-69.
8. **Jasty, V. and Chang, P.W.** (1971). *Envelopment of infectious bovine rhinotracheitis viral particles in bovine kidney cell cultures: An electron microscopic study*. Am. J. Vet. Res. 32 1945-1953.
9. **Kaplan, A.S.** (1973). *The Herpesviruses*. Acad. Press. New York.
10. **Kimman, T.G., Pol, J.M.A., De Wind, N., Oeil-Lie, N., Berns, A.J.M. and Gielkens, A.L.J.** (1992). *Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus*. Vet. Microbiol. 33: 45-52.
11. **Leestma, J.E., Bornstein, M.D., Sheppard, R.D. and Feldman, L.A.** (1969). *Ultrastructure aspects of herpes simplex virus infection in organized cultures of mammalian nervous tissue*. Laboratory Investigation, 20 (1): 70-78.
12. **Munz, E. and Goehel, E.** (1974). *Electron microscopical studies on "non-syncytia forming" bovine herpes viruses isolated in Tanzania*. J. Comp. Path. 33: 485-494.
13. **Nii, S., Morgan, C. and Rose, H.M.** (1968). *Electron microscopy of herpes simplex virus*. J. of BVirol. 2 (5): 517-536.
14. **Patrizi, G., Middelkamp, J.N., Reed, C.A.** (1967). *Reduplication of nuclear membranes in tissue-culture cells infected with guinea-pig cytomegalovirus*. Am. J. Pathol. 50: 779-790.
15. **Pol, J.M.A., Quint, W.G.V., Kok, G.L. and Broekhuysen-Davies, J.M.** (1991). *Pseudorabies virus infections in explants of porcine nasal mucosa*. Res. Vet. Sci. 50: 45-53.
16. **Poste, G.** (1972). *Characterisation of a new canine herpes virus*. Archiv. für die gesamte Virusforschung, 36: 147-157.
17. **Poste, G., Lecatsas, G and Apostolov, K.** (1972). *Electron microscopic study of the morphogenesis of a new canine herpes virus in dog kidney cells*. Archiv. für die gesamte Virusforschung, 39:317-319.
18. **Reynolds, E.S.** (1963). *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy*. J. Cell. Biol. 17: 208-217.
19. **Roy, S. and Wolman, L.** (1969). *Electro. Microscopic observations on the virus particles in herpes simplex encephalitis*. J. Clin. Path. 22: 51-59.

20. **Schulze, P., Liebermann, H., Hantschel, H., Bartha, A. and Juhasz, M.** (1967). *Licht- und elektronenmikroskopische untersuchungen an einem neuartigen bovinen herpes virus.* Arch. für. exp. Veterinarmedizin 21: 747-759.
21. **Seo, I.S.** (1979). *A comparative study of ultrastructural changes due to two bovine herpes viruses.* Korean Jour. of. Vet. Res., 19(1): 33-44.
22. **Skiner, M.S. and Mizell, M.** (1972). *The effect of different temperatures on herpes virus induction and replication in Luck/ tumor explants.* Laboratory Investigation 26 (6): 671-680.
23. **Smid, B., Valicek, L. and Pleva, V.** (1971). *Bovine herpes mamillitis (BHM) virus: Electron microscopy of the virus in tissue culture of primary bovine kidney cells.*Zbl. Vet. Med. B. 18:1-8
24. **Viloria, J.E. and Garcia, J.H.** (1976). *Human herpes simplex encephalitis (cellular events).* Beitr. path. Bd. 157: 14-22.
25. **Watson, D.H., Wildy, P. and Russell, W.C.** (1964). *Quantitative electron microscope studies on the growth of herpes virus using the technique of negative staining and ultramicrotomy.* Virology, 24: 523-536.