



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Bundesrepublik Deutschland

Etablierung eines Fischvirus empfänglichen Zellstammes aus Hypophysen des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.)

Establishment of a Fish Virus Susceptible Cell Strain from Pituitary of Carp (*Cyprinus carpio* L.)

L. RIBEIRO und W. AHNE

Mit 4 Abbildungen · Eingegangen am 8. Januar 1983

Abstract

A new continuous cell strain (CaPi) was established from normal pituitary tissue of carp, *Cyprinus carpio* L.

Cells of a fractionated dispersion (0.25% trypsin-PBS, 10 °C) of pituitaries formed monolayer (fibroblast- and epithelial-like-cells) at 25 °C using Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum and non essential amino acids. The continuous cell strain, designated CaPi, was obtained by an enzymatical selection of epitheloid cells from the monolayer of the primary pituitary cell culture. This culture has been subcultured 70 times over a period of 24 months. CaPi-cells multiply over a temperature range of 15–35 °C with an optimum growth temperature of 30 °C at a seeding density of 1.7×10^6 cells/ml. Chromosome analysis indicates the cells are heteroploid and show modal numbers of 47 chromosomes. The CaPi cell line is susceptible to fishviruses (VHSV, PFR, SVCV) producing cytopathic effects (CPE). However, IPNV replicates without visible cell alterations.

Zusammenfassung

Es wurde ein permanenter Zellstamm (CaPi) aus normalen Hypophysen des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) etabliert.

Die aus Karpfenhypophysen-Gewebe fraktioniert freigesetzten (0.25% Trypsin-PBS-Lösung, 10 °C) Zellen bildeten bei 25 °C unter Verwendung von Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), angereichert mit 10% fötalem Kälberserum und nichtessentiellen Aminosäuren einen Monolayer mit fibroblasten- und epithelähnlichen Zellen aus. Von dieser Primärkultur ist der CaPi-Zellstamm unter selektiver enzymatischer Ablösung der epithelähnlichen Zellen etabliert worden. Der Zell-Stamm wurde innerhalb 24 Monaten bisher 70mal subkultiviert. Die CaPi-Zellen vermehren sich bei Temperaturen zwischen 15–35 °C. Die optimale Zellvermehrung erfolgt bei 30 °C unter Verwendung einer Zelleinsaatmenge

von $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Modalwert der stetigen Verteilung der Chromosomen beträgt 47. Die CaPi-Zellen vermehren Fischviren mit ausgeprägtem zytopathischen Effekt (VHSV, PFR, SVCV), das IPNV repliziert sich ohne wahrnehmbare Zellalterationen.

Einleitung

Fischzellkulturen gewinnen für physiologische, toxikologische und virologische Studien zunehmend an Bedeutung. Unter den in der Literatur zitierten 61 permanenten Fischzellkulturen befinden sich nur 2 vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) abstammende Zell-Linien:

- a) der aus Flossengewebe hergestellte KGCP-1-Zellstamm,
- b) der aus neoplastischem Hautgewebe gewonnene EPC-Zellstamm (18).

Während über die Virusempfänglichkeit der KGCP-1-Zellen nichts bekannt ist und diese Zell-Linie in der Fischvirologie nicht verwendet wird, finden die EPC-Zellen (6) in vielen Laboratorien sowohl in der Routinediagnostik wie auch in der Forschung häufig Verwendung (3, 4). Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, daß die in verschiedenen amerikanischen und europäischen Laboratorien gehaltenen EPC-Zellen persistent mit einem Coronavirus infiziert sind (*Hertrik*, pers. Mitt.), was den weiteren Einsatz dieser Zell-Linie für virologische Zwecke problematisch machen dürfte.

Für die Erforschung und Diagnostik karpfenpathogener Viren ist aber das Vorliegen einer vom Wirtsfisch abstammenden Zell-Linie von Bedeutung, zumal beim Karpfen Viren existieren (z.B. das mit den „Karpfenpocken“ assoziierte Herpesvirus), die wegen der mutmaßlichen Wirtsspezifität bisher noch nicht isoliert werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, aus Karpfenhypophysenzellen, die primär der Untersuchung der Gonadotropinfreisetzung *in vitro* dienen (16), einen für die Fischvirologie geeigneten Zellstamm (CaPi) zu etablieren.

Material und Methodik

Fische

Als Zellspender dienten dreisömmerige Karpfen (*Cyprinus carpio* L.), die freundlicherweise vom Fischgesundheitsdienst Bayern e. V. in Grub bei München zur Verfügung gestellt worden sind. Die Fische befanden sich in einem guten gesundheitlichen Zustand und hatten ein Durchschnittsgewicht von 1500 ± 500 g.

Hypophysenentnahme

Die Fische wurden mit 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (Merck) (0,9 g/l H₂O) betäubt. Das Ausbluten der Tiere erfolgte durch Abschneiden des ventralen Endbereichs des 4. Kiemenbogens. Nach der Hautdesinfektion mit 70% Isopropanol ist durch aseptische Trepanierung das Gehirn freigelegt worden, das nach Durchschneiden der Medula oblongata und der kranialen Nerven entfernt worden ist. Die freiliegende Hypophyse wurde mit einem Scharflöffel entnommen und sofort in Minimal Essential Medium (MEM) + Antibiotika (60 µg/ml Gentamicin und 2,5 µg/ml Amphotericin B) übergeführt.

Aufschluß der Gewebe

Der Aufschluß der Hypophysen (16) erfolgte über 5 Std. mit 0,25% Trypsin in PBS (Phosphate buffered saline), (pH 7,2) mit Hilfe eines Magnetrührers bei 4 °C. Einzelne

stündlich abgenommene Fraktionen wurden bei 300 g für 10 Min. (4 -C) zentrifugiert und das Zellsediment ist mit Anzuchtmedium (Eagle's MEM, angereichert mit 10% fötalem Kälberserum und nichtessentiellen Aminosäuren und Antibiotika - Gentamicin 60 µg/ml und Amphotericin B 2,5 µg/ml) aufgenommen worden. Nach Bestimmung der Anzahl lebenden Zellen (0,5% Trypanblaulösung, Neubauer-Zählkammer) wurden die Fraktionen bei 10 °C aufbewahrt. Anschließend sind die gepoolten Zellsuspensionen durch Zugabe eines entsprechenden Volumens Anzuchtmedium auf 6×10^5 Zellen/ml eingestellt worden.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Plastikflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² (Falcon 3013) bei 25 °C. Innerhalb 7 Tagen waren die Zellen zu einem Monolayer mit gemischten Zelltyp (fibroblastenähnliche und epitheloide Zellen) ausgewachsen.

Gewinnung des permanenten Zellstammes (CaPi)

Durch selektive enzymatische Ablösung von epithelähnlichen Zellen einer konfluenten primären Karpfenhypophysenzellkultur (bestehend aus epithel- und fibroblastenähnlichen Zellen) wurde ein permanenter Zellstamm (CaPi) gewonnen. Die epithelartigen Zellen lösten sich innerhalb von 5 Min., die fibroblastenähnlichen dagegen erst nach ca. 10 Min. ab. Die selektiv abgenommenen, epithelähnlichen Zellen (CaPi) wurden in PBS aufgenommen, sedimentiert (400 g, 4 °C, 10 Min.) und mit Anzuchtmedium (5 ml) neu in Plastikflaschen (25 cm² - Falcon) eingesetzt.

Ermittlung der optimalen Zelleinsaatmenge

Die Feststellung der optimalen Zelleinsaatmenge für CaPi-Zellen erfolgte unter Einsaat von 1×10^5 , 2×10^5 , 6×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml. Die Zellvermehrung bei 30 °C wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen alle 24 Std. sowie 11 und 14 Tage nach der Einsaat ermittelt (Zellzahl aus jeweils 3 Kulturen).

Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur

CaPi-Zellen (6×10^5 Zellen/ml) wurden bei 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 37 °C inkubiert. Im 24stündigen Rhythmus sind die Zellvermehrungsraten von je 3 Kulturen untersucht worden.

Berechnung der Zellvermehrungskurven

Es wurde die Methode von *Aubert* (5) und *Paul* (14) verwendet. Nach Umwandlung der Formel ($N = N_0 e^{kt}$) erhält man die Gleichung: $\log N = \log N_0 + kt \log 2$.

Chromosomenanalyse

Die Chromosomenanalyse der Karpfenhypophysenzellkultur (1. Subkultur) und CaPi-Zellen (53. Subkultur) wurde nach der Methode von *Schroy* u. *Todd* (17) durchgeführt. Hierzu sind 24 Std. alte, in Leighton tubes gezüchtete Zellkulturen mit 20 µl einer 10^{-4} M Colchicin-Lösung für 12 Std. behandelt worden. Danach wurde das Medium abgossen und die Zellen kamen in hypotonischer PBS-Lösung (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) für 15 Min. bei Raumtemperatur zur Quellung.

Nach der Fixierung mit Essigsäure:Methanol (1:3) wurden die Präparate mit Aceto-Orcein (1% Orcein in 45% Essigsäure) gefärbt und nach Entwässerung mit Tert-butyl-Alkohol mit Eukit eingebettet.

Die Modalwerte der Chromosomenanzahl wurden nach folgender Formel berechnet:

$$D = U + \frac{n_0 - n^-_1}{2 \cdot n_0 - n^-_1 - n^+_1} \cdot b$$

U = untere Klassengrenze der am stärksten besetzten Klasse;

n_0 = Anzahl der Werte in der am stärksten besetzten Klasse;

n^-_1 und n^+_1 = Anzahl der Werte in der Nachbarklasse;

b = Klassenbreite.

Untersuchung über die Vermehrung von Fischviren in CaPi-Zellen

Der Zellstamm CaPi ist für die Virusanzucht, für Virustitrationen und für die Plaque-Technik verwendet worden.

In Plastikflaschen (25 cm³) dichtgewachsene CaPi-Zellkulturen wurden nach der Adsorptionsmethode (1 Stunde bei 15 °C) mit 100 kulturinfektösen Einheiten (KID₅₀) des Virus der hämorrhagischen Septikämie der Forellen (VHS), des Virus der infektiösen Pankreasnekrosen der Forellen (IPNV), des Pike Fry Rhabdovirus (PFR) und des Spring viremia of carp-Virus (SVCV) beimpft. Die infizierten Kulturen kamen bei 15 °C (IPNV- und VHS-infizierte Zellen) bzw. bei 20 °C (PFR- und SVCV-infizierte Zellen) bis zur Ausbildung einer 90%igen Zell-Lysis zur Inkubation. Das folgende Aufschließen der Zellen fand durch Gefriertauen bei -80 °C statt. Die erstmals in CaPi vermehrten Viren wurden in CaPi-Zellen und zusätzlich in den ursprünglichen Wirtszellen, d.h. IPNV in PG (1)- und PFR, SVCV sowie VHS in FHM (8)-Zellen, austitriert. Der Titer wurden nach der Methode von *Kärber* (10) bestimmt. Anschließend sind weitere 4 Passagen der Viren in CaPi-Zellen durchgeführt worden. Die Infektion der Kulturen erfolgte wie oben beschrieben mit 100 KID₅₀ der einzelnen passagierten Viren. Zur Feststellung der Plaquescharakteristika wurden in Petrischalen (8 cm²) gezüchtete konfluente CaPi-Zellkulturen für 1 Std. mit den verschiedenen Viren infiziert. Nach Absaugen des Inokulums sind die Zellen mit einer auf 38-40 °C erwärmten Agarose (1%)-Mischung (1:1 doppelkonzentriertes, hepesgepuffertes MEM mit 4% FKS) überlagert worden. Nach Gelieren der Agarose wurden die Kulturen zur Verhinderung der Austrocknung mit hepesgepuffertem Medium (1 ml) überschichtet (4).

Ergebnisse

Konfluente Karpfenhypophysenzellkulturen lieferten nach selektiver Ablösung mit STV zwei Zelltypen:

- a) schnell abzulösende epitheloide Zellen (CaPi), die sich weiterhin als vermehrungsfähig erwiesen (bis jetzt 70 Subkulturen) und
- b) fibroblastenähnliche Zellen, die sich nur begrenzt (1 bis 2mal) subkultivieren ließen.

Innerhalb von 24 Std. bis zu 100% dichtgewachsene CaPi-Kulturen beinhalteten im Durchschnitt $5,14 \pm 0,44 \times 10^5$ Zellen/cm² (n = 3) oder $2,57 \pm 0,22 \times 10^6$ Zellen/ml. Wurden diese Kulturen für weitere 8 Tage bei 30 °C unter 4maligem Mediumwechsel inkubiert, so zeigten die Zellen ein mehrschichtiges Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Zellkonzentration $1,12 \pm 0,06 \times 10^7$ Zellen/ml oder $2,24 \pm 0,11 \times 10^6$ Zellen/cm². Die CaPi-Zellen hielten sich bei 30 °C 14 Tage lang, bei 15 °C 2 Monate ohne Mediumwechsel in gutem Zustand. Danach waren die Zellen weiter subkultivierbar.

Zelleinsaat

Wie Abb. 1 zeigt, hatte die Zelleinsaatmenge auf die log-Phase der CaPi-Zellvermehrung kaum einen Einfluß. Die Korrelationskoeffizienten ($r = 0,9$) zeigten bei allen Einsaatmengen Übereinstimmung.

Um ein optisch wahrnehmbares Dichtwachsen der Zellen innerhalb von 24 Std. bei 30 °C zu erreichen, war eine Zelleinsaatmenge von $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml notwendig. Geringere Zellkonzentrationen verlängerten das Dichtwachsen entsprechend (Abb. 2).

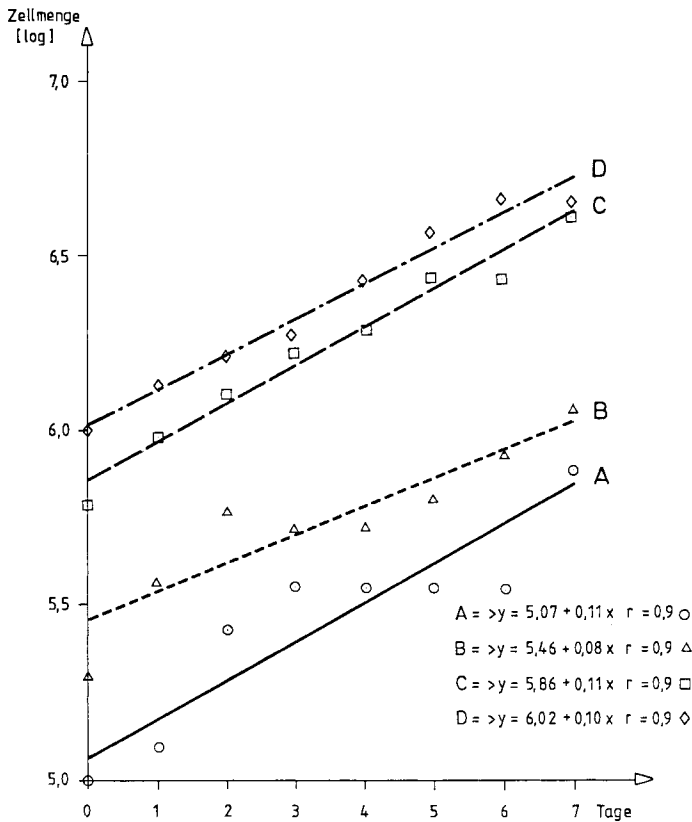


Abb 1 Linearisierte Kurven der log-Phase der CaPi-Zellvermehrung innerhalb 7 Tagen bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zelleinsaatmenge (r = Korrelationskoeffizient)

Inkubationstemperatur

CaPi-Zellen vermehrten sich in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 30 °C. Bei 10 °C war die Vermehrungsintensität stark reduziert, trotzdem behielten die Zellen bei dieser Temperatur ihre Lebensfähigkeit über 1 Monat. Als nichtvermehrungsfähige Temperaturen haben sich 5 °C und 37 °C für die CaPi-Zellen erwiesen.

Wie aus der linearisierten CaPi-Zellvermehrungskurve (Abb. 3) zu entnehmen ist, vermehren sich die Zellen bei 30 °C optimal ($b = 0,10$ und $r = 1$). Bei 15 °C wurde dagegen ein langsames ($b = 0,04$) und bei 20 °C und 35 °C ein unregelmäßigeres Wachstum beobachtet.

Subkulturen

Konfluente CaPi-Zellkulturen ließen sich mit Saline-Trypsin-Versen 1:2, 1:3 bis 1:4 subkultivieren. Die Zellen konnten in 48stündigem Rhythmus in der Regel 1:2 geteilt werden; momentan befinden sich die Zellen in der 70. Subkultur.

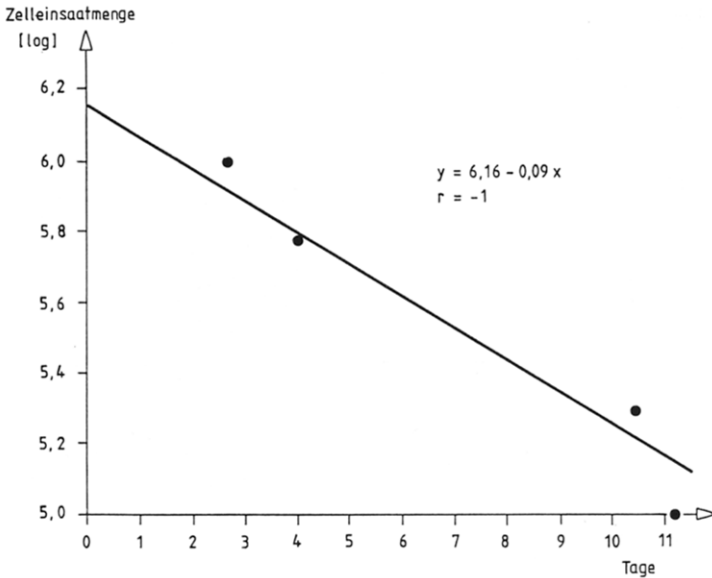


Abb. 2. Ausbildung von 100% dichten CaPi-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zelleinsaatmenge bei 30 °C innerhalb von 11 Tagen (r = Korrelationskoeffizient).

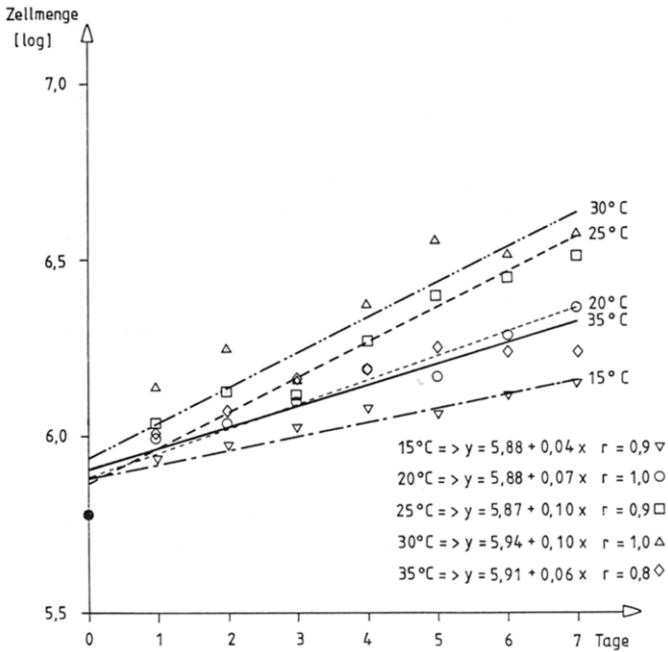


Abb. 3. Linearisierte Kurven der CaPi-Zellvermehrung in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur innerhalb von 7 Tagen (Zelleinsaatmenge: 6×10^5 Zellen/ml) (r = Korrelationskoeffizient).

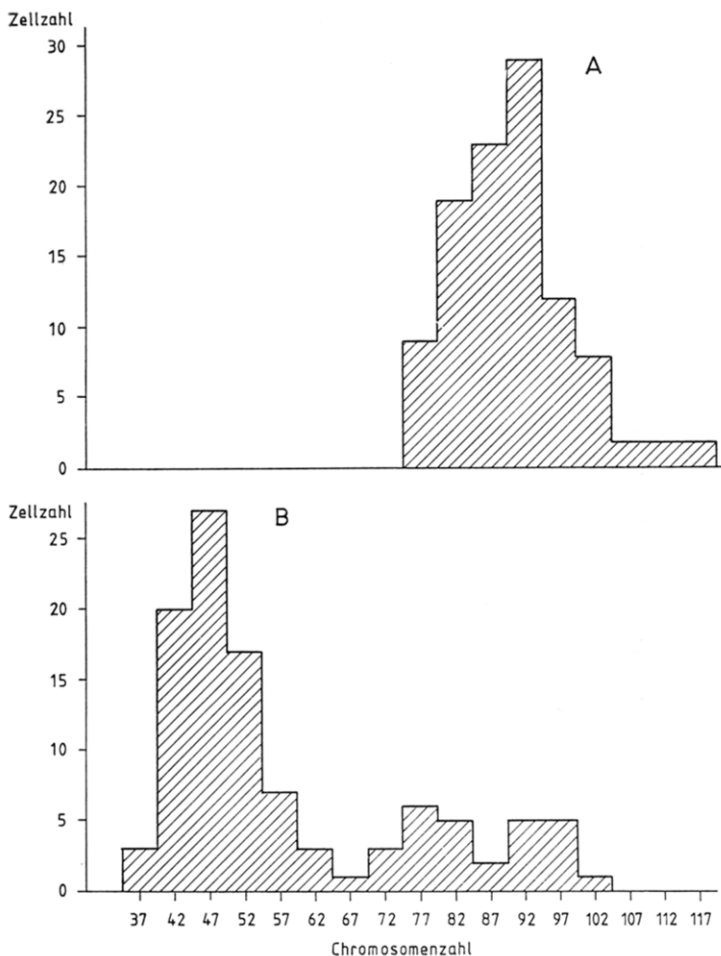


Abb. 4. Häufigkeitsverteilung der Chromosomen von Karpfenhypophysenzellen der 3. Subkultur (A) und von CaPi-Zellen der 53. Subkultur (B) (Anzahl der gezählten Zellen: 105).

Chromosomenanalyse

Die Häufigkeitsverteilung der Chromosomen normaler Karpfenhypophysenzellen in Kultur zeigten im Vergleich mit den CaPi-Zellen deutliche Unterschiede (Abb. 4). Der Modalwert der stetigen Verteilung der Chromosomen der Karpfenhypophysenzellen (3. Subkultur) ist 91, der der CaPi-Zellen (53. Subkultur) 47.

Vermehrung von Fischviren (VHS, IPNV, PFR, SVCV) in CaPi-Zellen

Die Rhabdoviren (VHS, PFR, SVCV) vermehrten sich in den CaPi-Zellen von der 1. bis zur 5. Passage mit Ausbildung zytopathischer Effekte (CPE) und charakteristischer Plaques.

Tabelle 1. Vermehrung von Fischviren (IPNV-Sp., PFR, SVCV, VHS-F₁) in CaPi-Zellen (40. Subkultur) nach Infektion mit 100 KID₅₀/Zellkulturflasche (25 cm² Zellwachstumsfläche) während 5 Passagen bei 20 °C (PFR, SVCV) bzw. bei 15 °C (VHS, IPNV)

Virus	Original-Viren log KID ₅₀ /0,1 ml, ursprüngl. Zellen	Virustiter (log KID ₅₀ /0,1 ml) Passagen in CaPi-Zellen					
		1	2	3	4	5	
		CPE %	CPE %	CPE %	CPE %	CPE %	
		Titer	Titer	Titer	Titer	Titer	
IPNV-Sp	8,2	80	20	4,8	7,2 ¹	n. u.	n. u.
PFR	4,3	100	100	8,2	7,2	100	100
SVCV	5,2	100	100	6,8	6,5	100	100
VHS-F ₁	6,5	100	100	7,5	7,8	100	100

¹ Zusätzliche Titration in PG-Zellen.

² Nicht untersucht.

Der SVCV-Titer blieb während 5 Passagen in CaPi-Zellen weitgehend konstant (6,2–6,8 log KID₅₀/0,1 ml). Das PFR zeigte zwischen der 1. und 2. Passage eine Titererhöhung von 6,5 auf 8,2 log KID₅₀/0,1 ml, danach erfolgte eine Stabilisierung der Titer auf den Ausgangswert (1. Passage). Der Infektionstiter des VHS blieb während der 5 Passagen ebenfalls weitgehend konstant (7,2–7,8 log KID₅₀/0,1 ml). Das IPN-Virus vermehrte sich in CaPi-Zellen (1. Passage) mit bis zu 80% ausgebildetem CPE und einem Titer von 7,2 log KID₅₀/0,1 ml. Ab der 2. Passage betrug die CPE-Ausbildung nur 20% und der Virustiter sank auf 4,8 log KID₅₀/0,1 ml (Titration in homologen Zellen). Ab der 3. Passage blieb der CPE aus, und es konnte bei einer Titration mit homologen Zellen kein Virusgehalt mehr ermittelt werden. Eine Kontroll-Titration in PG-Zellen ergab dagegen einen Virus-Titer von 7,2 log KID₅₀/0,1 ml, was auf eine nichtzytolytische Virusreplikation in CaPi-Zellen schließen läßt (Tab. 1).

Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird die Etablierung eines permanenten Zellstammes (CaPi-Zellen) aus Karpfenhypophysen beschrieben. Aus der Literatur sind bis jetzt nur zwei vom Fisch abstammende Hypophysenzellkulturen bekannt: Eine von Buntbarschen (15) zum Zwecke morphologischer Untersuchungen etabliert und eine von Regenbogenforellen (11) für morphologische und virologische Studien hergestellt.

Der Zellstamm (CaPi) unterscheidet sich hinsichtlich der Morphologie, Chromosomenanzahl sowie im Wachstumsverhalten von den ursprünglichen primären Hypophysenzellen. Während die primären Karpfenhypophysenzellen aus verschiedenen Zelltypen bestanden, sind die CaPi-Zellen rein epitheloid. Weiterhin wurde bei den Karpfenhypophysenzellen (3. Subkultur) ein Modalwert von 91, bei den CaPi-Zellen (53 Subkultur) von 47 hinsichtlich der stetigen Verteilung der Chromosomen ermittelt. Die Ursache der abweichenden Chromosomenanzahlen des Ausgangsmaterials ($2n = 104$) (7) und der in vitro kultivierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Bei fast allen untersuchten Zell-Linien wurde eine vom Ausgangsmaterial abweichende Chromosomenanzahl ermittelt. In der Regel verfügen Zell-Linien über triploide bis tetraploide Chromosomenanzahlen, allerdings wurden bei einigen Zell-Linien auch subdiploide Karyotypen festgestellt (zitiert nach 12).

Im Gegensatz zu den primären Karpfenhypophysenzellen zeigen die CaPi-Zellen keine Gonadotropinfreisetzung in vitro (16) und weisen stellenweise ein mehrschichtiges Wachstum auf. Außerdem wurde festgestellt, daß eine dichte Karpfenhypophysenzellkultur ca. 43% weniger Zellen enthält als eine dichtgewachsene CaPi-Zellkultur.

Sowohl für die Vermehrung primärer Karpfenhypophysenzellen als auch für die der CaPi-Zellen wurde die gleiche optimale Temperatur von 30 °C ermittelt. Die CaPi-Zellen ließen sich bei 15 °C ohne Mediumwechsel über 2 Monate in einem guten subkultivierbaren Zustand halten.

Mit Ausnahme des IPN-Virus vermehrten sich die untersuchten Viren (VHS, PFR, SVCV) in den CaPi-Zellen unter Ausbildung zytopathischer Effekte. Mit 100 infektiösen Einheiten des IPN-Virus infizierte Zellen zeigten einen bis zu 80% ausgebildeten CPE, der in der 2. Passage nur noch 20% betrug und eine Titerabnahme von

7,2 auf 4,8 log KID₅₀ aufwies. Bei der 3. Passage wurde kein CPE mehr beobachtet und es konnte auch mit den homologen Zellen kein Virus mehr nachgewiesen werden. Unter Verwendung von PG-Zellen (1) wurde dagegen dennoch eine IPN-Virusreplikation bei der 3. CaPi-Passage festgestellt. Ähnliche Beobachtungen haben *Nicholson et al.* (13) bei Infektionsstudien von 4 Fischzell-Linien mit verschiedenen IPNV-Isolaten gemacht. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, daß FHM-Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie den CaPi-Zellen ähnlich sind, nichtzytolytische IPNV-Replikationen aufweisen (9, 2, 3).

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, eignen sich die CaPi-Zellen für die *in vitro*-Vermehrung von Fischviren; insbesondere für das VHSV, PFR und SVCV. Die vergleichend in der Routinediagnostik eingesetzten FHM (8)- und EPC (6)-Zellen waren den CaPi-Zellen hinsichtlich der Sensitivität und der Virusausbeute nicht überlegen. Für die Isolierung karpfenpathogener Viren mit hoher Wirtszellspezifität (z.B. Herpesviren) könnten die CaPi-Zellen ein geeignetes Substrat darstellen.

Danksagung: Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt

Literatur

1. *Ahne, W.*: Fish cell culture: A fibroblastic line (PG) from ovaries of juvenile pike (*Esox lucius*). *In Vitro* 15 (1979) 839-840
2. *Ahne, W.*: IPN-Virus permanent infizierte Fischzellen: Untersuchungen über Zellvermehrung und Egtvedvirusreplikation. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A* 246 (1980) 304-307
3. *Ahne, W.* und *A. Weiler*: Untersuchungen zur Virusempfänglichkeit von Fischzellkulturen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 87 (1980) 56-59
4. *Ahne, W.* und *K. Wolf*: Viruserkrankungen der Fische. In: *Krankheiten und Schädigungen der Fische; H.-H. Reichenbach-Klinke* (Hrsg.), S. 55-105. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1980)
5. *Aubert, J.P.*: La croissance bactérienne. In: *Microbiologie Generale, I - Bacteries - Bacteriophages, F. Gasser* (ed.), pp. 163-169. McGraw-Hill (1975)
6. *Fijan, N.*: Unpubliziert
7. *Gold, J.R., W. J. Kavel,* and *M.R. Strand*: Chromosome formula of North American fishes. *Prog. Fish. Cult.* 42 (1980) 10-25
8. *Gravell, M.* and *R.G. Malsberger*: A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 126 (1965) 555-565
9. *Hedrick, R.P., J.C. Leong,* and *J.L. Freyer*: Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPN). *J. Fish. Dis.* 1 (1978) 297-308
10. *Kärber, G.*: Beiträge zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 162 (1931) 480
11. *Lehmann, J., V. Blüm, D. Mock* und *F.J. Stürenberg*: Die Hypophyse der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) als Zellspender zur Herstellung von Primärzellkulturen. *Fisch u. Umwelt* 9 (1981) 87-92
12. *Mauersberger, B.*: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1971)
13. *Nicholson, B.L., G.W. Thorne, C. Janicki,* and *A. Hauson*: Studies on a host range variant from different isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPN). *J. Fish. Dis.* 2 (1979) 367-376
14. *Paul, J.*: Zell- und Gewebekultur. W. de Gruyter Verlag, New York (1979)
15. *Rawdon, B.B.*: Ultrastructure of the non-granulated hypophysial cells in the teleost

- Pseudocrenilabrus philander* with particular reference to cytological changes in culture. Acta Zool. (Stockh.) 59 (1978) 25-33
16. *Ribeiro, L.* and *W. Ahne*: Fish cell culture: Initiation of a line of pituitary cells from carp (*Cyprinus carpio*) to study the release of gonadotropin in vitro. In Vitro 18 (1982) 419-420
 17. *Schroy, C. B.* and *P. Todd*: Method for preparing chromosome spreads of glass-attached cultured animal cells. TCA Manual 2 (1976) 287-289
 18. *Wolf, K.* and *J. A. Mann*: Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. In Vitro 16 (1980) 168-179
 19. *Wolf, K.* and *W. Ahne*: Fish cell culture. In: Advances in cell culture; *K. Maramorash* (ed.), Vol. 2, pp. 305-328. Academic Press, New York (1982)

Professor Dr. *Winfried Ahne*, Institut für Zoologie und Hydrobiologie, Kaulbachstr. 37, D-8000 München 22