

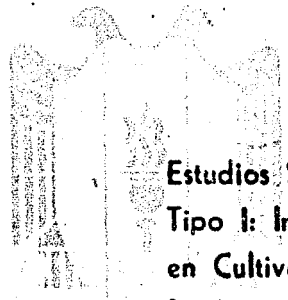
2. folios
1.0 exámenes
7. diligencias

T. 1134

61 (04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIVERSIDAD MOTOLINIA FACULTAD DE QUIMICA



**Estudios Sobre el Virus de la Poliometitis
Tipo I: Inactivación Térmica y Propagación
en Cultivo de Tejidos de Riñón de Mono
Sarahuato.**

T E S I S
Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :

MARGARITA DURAN VIDAURRI

México, D. F.

1957



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*A mis Padres y Hermanos
con todo mi Cariño.*

*Con sincero agradecimiento a mi maestro
y Director de Tesis Dr. José Sosa
Martínez.*

*Doy las más expresivas gracias al Sr.
Dr. Luis Gutiérrez Vallegas, Di-
rector de la División de Inves-
tigación Biológica de la Industria
Nacional Químico Farmacéutica
S. A. de C. U. por haberme per-
mitido realizar este trabajo en
dichos Laboratorios.*

Introducción.

Material y Métodos.

Resultados.

Discusión.

Bibliografía

I N T R O D U C C I O N

La biología del virus de la poliomielitis ha sido estudiada activamente en los últimos años. Sin embargo, estos esfuerzos se han redoblado desde que Enders y colaboradores (1949) pudieron -- propagar a los virus de la poliomielitis en cultivos de tejidos -- no nerviosos, y posteriormente Dulbecco y Vogt (1954) y Younger -- (1954) simplificaron aún más las técnicas cuando lograron propa-- gar el virus de la poliomielitis en cultivos de tejidos de célu-- las obtenidas por tripsinización de riñón de mono. De igual mane-- ra los estudios efectuados tendientes a clasificar antigénicamen-- te cepas aisladas de este virus demostraron que ellas podían cla-- sificarse en 3 grupos (The Committee on Typing of the National -- Foundation for Infantile Paralysis, 1951; Keessel et al., 1951; -- Salk et al. 1951; Salk et al., 1951) lo cual vino a constituir un -- gran avance en el conocimiento de la biología del virus de la po-- liomielitis, ya que aclaraban conceptos que habían aparecido como muy confusos anteriormente. Además de esto, la utilización de me-- dios nutritivos sintéticos (Morgan et al., 1950) permitió obtener-- suspensiones de virus con una cantidad de proteína extremadamente baja, y así se ha procedido a hacer investigaciones sobre las ca-- racterísticas del virus, como por ejemplo, acción de agentes fisi-- cos y químicos sobre su capacidad de reproducción, sin que subs-- tancias extrañas como proteínas, interfieran considerablemente en estos estudios.

Por otra parte continuamente se trata de conocer el espectro de susceptibilidad de diferentes huéspedes para el virus de la po--

liomielitis. Desde hace algunos años, Sabin y Olitsky (1936) habían logrado propagar el virus de la poliomiélitis en cultivos de tejido nervioso, pero su tentativa en cultivos de otros órganos - habían fallado. En esta época el mono era en realidad el único animal susceptible, además del hombre, a todas las cepas en general del virus de la poliomiélitis, sin embargo, su obtención, mantenimiento y manejo, hacían su uso prohibitivo en muchos laboratorios. Posteriormente Armstrong (1939) logró adaptar la cepa Lansing al ratón. Aún así quedaban muchas otras cepas que no podían ser estudiadas sino únicamente en monos de los Continentes Asiático y Africano. Los descubrimientos referidos anteriormente de Enders y colaboradores vinieron a simplificar definitivamente el manejo de estos virus. Los primeros órganos estudiados en donde era posible la propagación del virus eran, de origen humano: cerebro y médula espinal, piel, músculo, intestino, suprarenal, riñón, tiroideas, pulmón, brazo, corazón, timo, prepucio, útero, testículo, placenta y otros, y de mono: testículo, riñón, músculo, cerebro, médula espinal, pulmón e intestino.

En el presente momento podemos decir que el cultivo de tejidos usado en una escala más amplia consiste en el producido por la utilización de células obtenidas por tripsinización de riñón de mono, tanto cynomolgus como rhesus.

Existen varios experimentos sobre la inactivación del virus de la poliomiélitis por medio de calor, y entre ellos tenemos por ejemplo, el estudio de Lawson y Melnick (1947) sobre el virus de la poliomiélitis del ratón. Estos autores encontraron que el grado de inactivación del virus aumenta al aumentar la temperatura,-

y ya desde 55°C la velocidad de inactivación es bastante rápida. Sin embargo, los mencionados autores trabajaron con virus contenido en tejido nervioso de rata y ratón infectados con estos virus, y por lo tanto al contener estas suspensiones gran cantidad de proteína extraña al virus, es muy posible que ésta en algunas ocasiones ejerza un efecto protector sobre el virus, y así por ejemplo esto muy bien pudo haber ocurrido porque en ocasiones el virus en cantidades muy pequeñas permanecía activo cuando la suspensión era calentada a 65 y 70° por 30 minutos. Los mismos autores demostraron que la adición de leche a la suspensión de virus confería a éste una protección contra el efecto inactivante del calor. Por lo tanto pensamos de interés el efectuar determinaciones sobre la acción del calor en la actividad de reproducción del virus de la poliomielitis, considerando que al usar en el presente trabajo suspensiones de virus conteniendo una mínima cantidad de proteínas (0.04 mg. de N proteico por ml) los datos obtenidos se acercarian más a la realidad sobre las características propias del virus. Mientras este trabajo se encontraba en desarrollo, Youngner (1956) publicó algunos datos sobre este mismo tipo de estudios, pero usando volúmenes de suspensión de virus mayores que los utilizados en el presente trabajo.

Con respecto a la reproducción del poliovirus en cultivo de tejidos de riñón de mono sarahuato, mencionaremos que otros autores -- han hecho experimentos similares con diferentes tipos de monos aparte de los muy usados cynomolgus y rhesus. Kaplan (1955) y Kaplan y Melnick (1955) utilizando cultivos de tejidos de riñón de mono Capuchino, encontraron que las células cultivadas presentaban una resistencia a sufrir alteraciones morfológicas después de ser infectadas-

con poliovirus, a pesar de que el virus alcanzaba a reproducirse en dichos cultivos. Así pues, las especies de monos *Macaca mulatta* (mono rhesus) y *Macaca irus* (mono cynomolgus) son las que han dado mejores resultados desde el punto de vista de rendimiento de virus y de susceptibilidad de células infectadas a sufrir una degeneración-consecuente a la infección, efecto citopatogénico muy utilizado en las titulaciones de virus y de anticuerpos, ya que en términos generales y para estas dos monas mencionadas todas las células de un cultivo son igualmente infectadas y sufren la misma degeneración.

El mono sarahuato es susceptible a la infección experimental cuando es inoculado intracerebralmente y padece, consecuentemente a la infección, una parálisis poliomiélica (Rodaniche 1952). - Estudios anteriores efectuados en este laboratorio (Sosa-Martínez, - Gutiérrez Villegas y de la Torre, datos no publicados) demostraron que los cultivos de tejidos producidos por el método de células - - triplicadas de riñón de monos sarahuatos presentaban una gran diversidad en la intensidad de la reacción celular consecuente a la infección con distintas cepas de poliovirus tipo I, es decir, mientras que unas cepas producían un efecto citopatogénico rápido y claro, otras cepas no eran capaces de producirlo en apariencia. Por lo tanto fué de interés conocer las curvas de reproducción en estas células cultivadas de riñón de mono sarahuato.

MATERIAL Y METODOS

Virus.- Los virus utilizados en estos estudios fueron los siguientes: a) para los estudios de inactivación utilizamos la cepa P2226 proporcionada gentilmente por el Dr. Albert B. Sabin de Cincinnati, Ohio.- Esta cepa corresponde a un virus tipo I de virulencia atenuada que produce un efecto citopatogénico marcado en células cultivadas de riñón de cynomolgus y de rhesus. El inóculo consistió en líquido sobrenadante de cultivo en tubos de riñón de cynomolgus producidos por el método de - - tripsinización de Dulbecco y Vogt (1954) y de Youngner (1954). Los medios líquidos nutritivos consistieron en el llamado medio 199 (Morgan et al, 1950) que contiene sales minerales, glucosa, vitaminas, aminoácidos y rojo de fenol como indicador y en el de Melnick (Melnick y Roodan, 1952) que es una solución de hidrolizado de lactoalbúmina en solución balanceada de Hanks con 5% de suero de caballo inactivado. Las determinaciones de nitrógeno proteico demostraron tener una concentración de 0.09 mg por ml. El pH de las suspensiones fué ajustado a 7.6. La suspensión de virus correspondió al líquido sobrenadante de cultivos de -- tejidos después de 48 horas de infección y fué preparado en suficiente cantidad para todas las determinaciones. El líquido antes de ser envasado y almacenado fué filtrado por bujías de cristal Pyrex de poro ultrafino (UF). Después fué envasado en cantidades de 1 ml y conservado en un gabinete de hielo seco. b) Las cepas de virus utilizadas en los estudios de propagación en riñón de sarahuato fueron las de tipo I aisladas de las materias fecales de niños poliomiélticos de la Ciudad de México (Campillo, Sosa y Aranda, datos no publicados). Originalmente -- las cepas fueron aisladas en cultivos de tejidos de embrión humano pre-

parado por el método de Endera, y posteriormente pasadas 2 ó 3 veces en cultivos de tejidos de riñón de cynomolgus, preparados por el método de tripsinización. En el último pase se preparó suficiente inóculo para estos estudios, conservándolo también en gabinete de hielo seco. Todas estas cepas produjeron un rápido y claro efecto citopatogénico en células cultivadas de cynomolgus, así como en fibroblastos de cultivos de tejidos de embrión humano; pero en cultivo de tejidos de riñón de sarahuato su efecto era mucho más lento y menos claro, al grado que algunas de ellas necesitaban de 5 a 10 días para producirlo, mientras que en los cultivos de tejidos de riñón de cynomolgus el efecto era visible a las 48 horas.

Cultivo de tejidos.- En estos experimentos se prepararon cultivos de tejidos en tubo de riñón de cynomolgus o sarahuato por el método de tripsinización (Dulbecco y Vogt, 1954; Youngner, 1954). En breves palabras este método consiste en lo siguiente: se utilizan monos sanos, los cuales se sacrifican inyectándoles Evipán sódico en exceso, al entrar el animal en narcosis los riñones se extraen con técnica aséptica, procurando eliminar la sangre que contienen en lo más posible. Estos riñones se recogen en una solución reguladora de fosfatos fría y se pasan a un laboratorio bacteriológico en donde se descapsulan y se seccionan, seleccionando preferentemente la corteza. Esta seccionadura se hace con tijeras uterinas hasta obtener fragmentos de aproximadamente un milímetro de diámetro, los cuales se lavan varias veces con solución reguladora fría y luego se ponen en un baño de tripsina al 0.5%, entre 33 y 35°C. En ciclos sucesivos los fragmentos sumergidos se agitan por medio de un agitador eléctrico durante 10 minutos, se dejan decantar los fragmentos y el sobrenadante que contiene células-

aisladas se pasado a un baño de hielo fundente para inhibir la acción de la tripsina. A los fragmentos de fiñón se vuelve a agregar solución de tripsina y se agitan. Las células aisladas son lavadas posteriormente 2 ó 3 veces para eliminar la tripsina y enseguida se suspenden en el medio nutritivo a una concentración de aproximadamente 1:1000 - que equivale a 300,000 células por ml. El líquido nutritivo usado también fué el medio 199 adicionado de suero de caballo al 5% de antibióticos, penicilina y estreptomicina a una concentración de 100 unidades y 100 microgramos por ml. respectivamente. Esta suspensión de células se pasa a tubos de tejidos en cantidad de 1 ml y los tubos que las contienen se incuban inclinados a 37°. De esta manera, a los cuatro días se obtiene una capa de desarrollo celular en una de las porciones de la pared del tubo. El medio nutritivo se cambia, restituyéndolo por medio franco en cantidad de 1 ml y los tubos son inoculados con 0.1 ml del inóculo en estudio.

Monos.- Se utilizaron ejemplares de la especie *Macaca irus* -- (mono cynomolgus) y de *Alouatta palliata* (mono sarahuato). Los primeros fueron obtenidos de las Islas Filipinas a través de proveedores organizados y los últimos del estado de Campeche por gentileza del Jefe de los Servicios Coordinados de este estado. Todos ellos fueron -- ejemplares adultos y dieron reacción negativa a la tuberculina bruta sin diluir por inyección intrapalpebral y estuvieron sujetos a un régimen alimenticio balanceado.

Método de inactivación del virus.- Se utilizó un baño maría de una temperatura constante a 55°C, con una variación de $\pm 0.5^\circ\text{C}$, agitando constantemente con agitador eléctrico. La suspensión de virus fué puesta, en los ensayos preliminares, en ampollitas de 2 ml conteniendo 1 ml del virus. Posteriormente se utilizaron capilares de pared

guy delgada de aproximadamente 5 cm de largo conteniendo de 0.1 a 0.2 ml de suspensión de virus. En cada experimento se introdujeron al baño unos 20 capilares conteniendo el virus, se empezaba a tomar el tiempo y a diversos intervalos se sacaban 5 capilares que se pasaban a un baño de hielo. Las determinaciones correspondientes al tiempo 0 corresponden al título de infectividad de capilares tomados al azar que en lugar de ser puestos en baño maría fueron introducidos directamente en el baño de hielo.

Método de titulación del virus.- En los experimentos de inactivación por medio del calor el líquido de los capilares correspondientes a una muestra era pasado a tubos y de ahí se partía para hacer las diluciones progresivas al décimo. Se utilizó como diluyente una solución balanceada de Hanks. El líquido sin diluir se expresa en los cuadros y gráficas como de una dilución 10^0 expresada en logaritmos.

En los estudios de propagación del virus determinando las curvas de reproducción, los líquidos de varios tubos extraídos de la incubadora a un determinado tiempo se mezclaban y diluían como se dijo anteriormente.

En todos los casos se procuró utilizar al hacer las diluciones cuando menos 0.5 ml para hacer cada dilución, en ningún caso utilizando la porción terminal de la pipeta. También se tomó como regla el no transferir el volumen para diluir con la pipeta, la cual se descartaba, utilizando una nueva pipeta para efectuar la mezcla del diluyente y del líquido agregado, tomando el volumen necesario para pasarlo al siguiente tubo de dilución, descartando la pipeta, y así sucesivamente.- Los tubos de las diluciones de virus siempre se tuvieron en una gradilla sumergida en hielo con objeto de evitar lo más posible el deterioro del virus; y tan pronto se hicieron las diluciones se procedía inmediatamente a hacer las inoculaciones en los tubos de cultivos de tejidos.

RESULTADOS

Inactivación térmica del virus.- La inactivación de los virus para la preparación de vacunas de virus muertos principalmente se lleva a cabo con sustancias químicas del tipo del formaldehído o del fenol, o por la acción de la irradiación ultravioleta. En todos estos casos -- siempre se procura respetar lo más posible las propiedades antigénicas del virus. Para el caso de los agentes químicos la acción de las sustancias mencionadas puede ser con frecuencia un tanto drástica y -- cabe la posibilidad de que los grupos proteicos constituyentes del -- principio inmunizante sufran antigénicamente una desnaturalización en detrimento de su capacidad inmunizante. Así pues, ante la posibilidad de preparar como vacuna un virus inactivado por medio del calor, se -- pensó conveniente ante todo, hacer estudios sobre las curvas de inactivación que presenta el poliovirus.

Para este objeto se utilizó una suspensión de virus, que como dije -- mos anteriormente, contiene muy pequeña cantidad de proteína extraña. Los experimentos se efectuaron en capilares anteriormente descritos, -- los cuales fueron sujetos a una temperatura de 55°C por diferentes in -- tervalos.

En los cuadros 1 y 2 y gráficas 1 y 2 se dan los resultados de ex -- perimentos preliminares hechos para conocer el tiempo necesario para -- su inactivación total. Estos resultados demuestran que el virus se -- inactivó entre 5 y 10 minutos después de estar sujeto a 55°C en un vo -- lumen de 0.1 a 0.2 ml. Los dos experimentos efectuados en diferentes -- días fueron indicativos de lo reproducible de los resultados, ya -- que los datos obtenidos concuerdan entre sí. Un número suficiente de -- titulaciones sobre la infectividad de una misma suspensión de virus -- efectuada anteriormente nos indicaron que el método utilizado en es--

tas titulaciones dió una variación de ± 0.3 de logaritmo (diluciones expresadas en logaritmos)

Con el objeto de usar un mínimo de volumen del virus presentando al mismo tiempo una mayor superficie de exposición al medio inactivante, en los experimentos siguientes el virus se envasó, en los tubos semicapilares descritos anteriormente, en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml. Al mismo tiempo, se tomaron muestras a intervalos menores -- con el objeto de conocer la velocidad de inactivación del virus a 55°C, de cada muestra se hizo una titulación de la infectividad residual. Los resultados de estos experimentos se dan en los cuadros 3, 4 y 5 y gráficas 3, 4 y 5. Ellos demostraron que el virus se fué inactivando progresivamente, es decir, la infectividad residual fué inversamente proporcional al tiempo de inactivación. En ninguno de los experimentos se observó que la última porción del virus vivo necesitase de un período de calentamiento excesivamente largo.

Los experimentos efectuados con 1 ml de suspensión de virus envasado en ampollitas de 2 ml de capacidad demostraron que a mayor volumen sujeto al medio inactivante mayor es el tiempo necesario para producir la inactivación total, y así por ejemplo, cuando se usaron los capilares conteniendo de 0.1 a 0.2 ml de virus la inactivación total ocurrió a los 6 minutos de calentamiento a 55°C, mientras que al utilizar ampollitas conteniendo 1 ml, el tiempo requerido para la inactivación total del virus, desde el punto de vista de su capacidad de reproducción, correspondió a un intervalo de 30 minutos (cuadros 6 y 7 y figuras 6 y 7).

Propagación del poliovirus tipo I en cultivos de tejidos de riñón de mono sarahuato. Como ya dijimos, experimentos anteriores efectuados en este laboratorio habían demostrado que distintas cepas de polio

virus tipo I habían producido un efecto citopatogénico muy variable en intensidad, por lo tanto, se hicieron investigaciones con el objeto de conocer si en realidad algunas cepas se reproducían en estos cultivos. Para tal objeto cada una de las cepas estudiadas se inoculó en 15 tubos de cultivo de riñón de carabuateo con 0.1 ml de cada una de las cepas sin diluir contenidas en el líquido sobrenadante de cultivos infectados de riñón de cymomelgum. Los tubos inoculados se pusieron en un rotor a girar a 17°C por espacio de dos horas, al cabo de las cuales se sacaron de la incubadora y se procedió a lavarlos con solución de Hanko con el objeto de eliminar el virus que no habiendo sido absorbido por las células quedara en el líquido sobrenadante. La operación del lavado se efectuó de ocho a diez veces con 2 ml de solución de Hanko, al final del cual se reconstituyó en volumen igual con medio de Melnick con 5% de suero de caballo inactivado. Los tubos así lavados se pusieron a rotar nuevamente. Inmediatamente después de lavar se tomaron tres tubos cuyo contenido fué mezclado y titulada su infectividad; esta titulación corresponde al tiempo 0 de las gráficas 8, 9 y 10 y cuadros 8, 9 y 10. Nuevos tubos se volvieron a tomar a los 2, 5, 8 y 12 días de haber efectuado la inoculación. El líquido correspondiente de tubos de una misma muestra fué mezclado y titulado. Antes de tomar las muestras se hizo una observación microscópica de los tubos inoculados.

Los cuadros así como las gráficas correspondientes nos demostraron en primer lugar que las alteraciones celulares ocasionadas por infección del virus no son constantes en todos los tubos y lo que es más probable ni siquiera en todas las células. Mientras que unos tubos no presentaban alteración alguna, otros enseñaban un efecto citopatogénico que no se manifestaba en la totalidad del cultivo. En más, fué de-

nuestra impresión que en un mismo tubo había gran variación en lo que -- respecta a susceptibilidad de las células a sufrir el efecto citopatogénico ya que era posible observar células normales alternando con células muy degeneradas.

Los resultados de las titulaciones nos indicaron que la mayor parte de las cepas demostraron típicas curvas de crecimiento, por ejemplo - aquéllas en donde el virus fué lavado (tiempo 0) el título de infectividad fué alrededor de $10^{-1.5}$ debido probablemente a virus residual no eliminado, pero a las 24 ó 48 horas después se pudo demostrar claramente un aumento en la concentración del virus que no dejó dudas sobre la capacidad de reproducción del virus en este tipo de cultivo de tejidos a pesar de que el efecto citopatogénico no fué claramente observado.



Mono Surahunto



Monos Cynomolgus

D I S C U S I O N

Los experimentos de inactivación del virus de la poliomielitis tipo I demostraron que el virus es sensible a la acción del calor, ya que es destruido en unos cuantos minutos cuando se usan pequeños volúmenes de suspensión en recipientes de paredes muy delgadas y que hacen que la suspensión del virus presente una amplia superficie de exposición al medio inactivante.

Existen algunos trabajos sobre la inactivación de otros virus por medio del calor, en donde se demuestra que la inactivación no corresponde a una reacción de primer orden, ya que la velocidad de inactivación va disminuyendo al grado que para inactivar las últimas porciones de virus se necesita un tiempo más largo. Sin embargo en nuestra opinión creemos que en los fenómenos de inactivación existen muchos factores que intervienen directamente entre el virus y el agente inactivante y como ejemplo pondremos la influencia de los uratos sobre la inactivación del virus de Newcastle por medio de la luz ultravioleta (Sosa Martínez, Hierro Romero, 1955) en donde los uratos protegen al virus del efecto inactivante de este tipo de irradiación. Como dijimos anteriormente Lawson y Melnick demostraron que la adición de leche a una suspensión de virus de poliomielitis murina interfería en el efecto inactivante del calor, así pues para hacer comparaciones respecto a la acción inactivante del calor, de los diferentes virus, se deberán tomar en cuenta los vehículos usados, ya que estos difieren considerablemente en los diferentes trabajos que tratan sobre este tema. Nosotros no tenemos suficientes datos para decir si la inactivación del poliovirus tipo I por medio del calor sigue los lineamientos de una reacción de primer orden.

En lo concerniente a la propagación del virus en cultivo de tejidos

de riñón de sarahuato, los experimentos dados en el presente trabajo - así, como experiencias previas efectuadas en este laboratorio, indican que estos cultivos presentan una mayor resistencia que los cultivos de riñón de cynomolgus a sufrir alteraciones citológicas. Además de esto, es importante mencionar que no todas las células de un mismo cultivo - desarrollan dichas lesiones lo que ha sido previamente demostrado por Kaplan quien utilizando cultivos de mono Capuchino encontró que algunos cultivos no sufrían ningún efecto citopatogénico y en otros únicamente un porcentaje mínimo fueron capaces de reproducir al virus, - - mientras que el resto de las células ni se infectaban ni sufrían alteración alguna. Así pues parece ser que hasta el momento el mono sarahuato por sí solo tiene muchas limitaciones para ser usado en trabajos de poliomielitia de cultivos de tejidos, cabe sin embargo hacer resaltar que muchas de las cepas produjeron en estos cultivos de riñón de - mono sarahuato, concentraciones de 6,000,000 TCID₅₀ por ml, que si - - bien son algo inferiores a los que se pueden obtener en cultivos de riñón de mono cynomolgus no son del todo despreciables y por lo tanto se impone la necesidad de efectuar nuevas experiencias con el objeto de - descubrir la manera de aprovechar estos monos en trabajos sobre el virus de la poliomielitia y otros virus.

Cuadro 1.- Determinación del tiempo necesario para inactivar la cepa P222b de poliovirus tipo I cuando es sometida a una temperatura de 55° C en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

Tiempo (minutos)	Efecto citopatogénico			
	Tubos			
	1	2	3	4
0	+	+	+	+
5	+	+	+	+
10	0	0	0	0
15	0	0	0	0

+ = Efecto citopatogénico positivo.

0 = Efecto citopatogénico negativo.

Cuadro 3.- Titulación de la infectividad residual de la cepa P 2226 de poliovirus tipo I cuando es sometida por diversos intervalos a una temperatura de 55°C. en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

Tiempo (minu- tos)	EFECTO CITOPATOGENICO								Titulo TCID ₅₀
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0					+,+,+,+	+,+,+,+	+,0,0,0	0,0,0,0	10 ^{-5.6}
5	+,+,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0				10 ^{-0.5}
10	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						< 10 ⁰
15	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						< 10 ⁰

* 4 tubos por dilución
 + =Efecto citopatogénico positivo.
 0 =Efecto citopatogénico negativo.

Cuadro 4.- Titulación de la infectividad residual de la cepa P 2226 de poliovirus tipo I cuando es sometida por diversos intervalos a una temperatura de 55°C. en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

Tiempo (minutos)	EL EFECTO CITOPATOGÉNICO								TÍTULO TCID ₅₀	
	DILUCIONES									
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
0					•	•,•,•,•	•,•,•,•	0,0,0,0	0,0,0,0	10 ^{-5.5}
3		•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,0,0,0	0,0,0,0				10 ^{-3.5}
6	•,•,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0							
9	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0							

* 4 Tubos por dilución
 +=Efecto citopatogénico positivo
 0=Efecto citopatogénico negativo

Cuadro 5.- Titulación de la infectividad residual de la cepa P 2226 de polio-virus tipo I cuando es sometida por diversos intervalos a una temperatura de 55° c. en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

Tiempo (minu- tos)	E F E C T O C I T O P A T O G E N I C O								TITULO TICD 50
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0					*	+,+,+,+	0,0,0,0	0,0,0,0	10 ^{-5.5}
3			+,+,+,+	+,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0			10 ^{-2.8}
6	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0					
9	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0					

* 4 tubos por dilución
 +=Efecto citopatogénico positivo
 0=Efecto citopatogénico negativo

Cuadro 6.- Titulación de la infectividad residual de la cepa P 2226 de poliovirus tipo I cuando es sometida por diversos intervalos a una temperatura de 55°c. en volúmenes de 1.0 ml.

Tiempo (minu- tos)	E F E C T O C I T O P A T O G E N I C O								Título TCID ₅₀
	D i l u c i o n e s								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0					*,*,*,*	*,*,*,*	0,0,0,0	0,0,0,0	10 ^{-5.5}
30	+,+,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						10 ^{-0.5}
60	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						10 ⁰
90	0,0,0,0	0,0,0,0							10 ⁰

* 4 tubos por dilución

+ = Efecto citopatogénico positivo

0 = Efecto citopatogénico negativo.

Cuadro 7.- Titulación de la infectividad residual de la cepa P 222b de poliovirus tipo I cuando es sometida por diversos intervalos a una temperatura de 55°C en volúmenes de 1.0 ml.

Tiempo (minutos).	Efecto Citopatogénico								Titulo TCID ₅₀
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0					* +.,+.,+.,+	+.,+.,+.,+	+.,+.,0,0	0,0,0,0	10 ^{-6.0}
15	+.,+.,+.,+	+.,+.,+.,+	0,0,0,0	0,0,0,0					10 ^{-1.5}
30	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						10 ⁰
45	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0						

- * 4 tubos por dilución
 + = Efecto citopatogénico positivo.
 0 = Efecto citopatogénico negativo.

Cuadro 8.- Reproducción de la cepa N° 60 de poliovirus tipo I
 en cultivo de riñón de mono sarahuato. Titulaciones
 efectuadas en cultivo de riñón de mono cynomolgus.

Tiempo después de la i- nocula- ción. (días)	E F E C T O C I T O P A T O G E N I C O								Titulo TCID ₅₀
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0	*								10 ^{-1.5}
	+,+,+,+	+,+,+,+	0,0,0,0	0,0,0,0					
1									10 ^{-5.0}
	+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,0,0	0,0,0,0		
6									10 ^{-3.5}
		+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,+,+	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0		

* 4 tubos por dilución

+ = Efecto citopatogénico positivo

0 = Efecto citopatogénico negativo.

Cuadro 9.- Reproducción de la cepa No 10 de poliovirus tipo I
en cultivo de riñón de mono sarahuato. Titulaciones
efectuadas en cultivo de riñón de mono cynomolgus.

Tiempo después de la i- nocula- ción. (días)	Efecto Citopatogénico								Título TCID ₅₀
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0	* +,+,+,0	0,0,0,0	0,0,0,0						10 ^{-0.3}
1		+,+,+,+	+,+,+,+	+,+,+,+	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0		10 ^{-3.5}
5			+,+,+,+	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0			10 ^{-2.0}

* 4 tubos por dilución

+ = Efecto citopatogénico positivo

0 = Efecto citopatogénico negativo

Cuadro 10.- Reproducción de la cepa No 9 de poliovirus tipo I
 en cultivo de riñón de mono naranhuato. Titulaciones
 efectuadas en cultivo de riñón de mono cynomolgus.

Tiempo después de la i- nocula- ción. (días)	Efecto Citopatogénico								Título TCID ₅₀
	Diluciones								
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0	* +,+,+,+	+,+,+,+	+,+,0,0	0,0,0,0					10 ^{-2.0}
1				+,+,+,+	+,+,+,0	+,0,0,0	0,0,0,0		10 ^{-4.5}
6			-+,+,+	+,0,0,0	0,0,0,0				10 ^{-2.7}

* 4 tubos por dilución

+ = Efecto citopatogénico positivo.

0 = Efecto citopatogénico negativo.

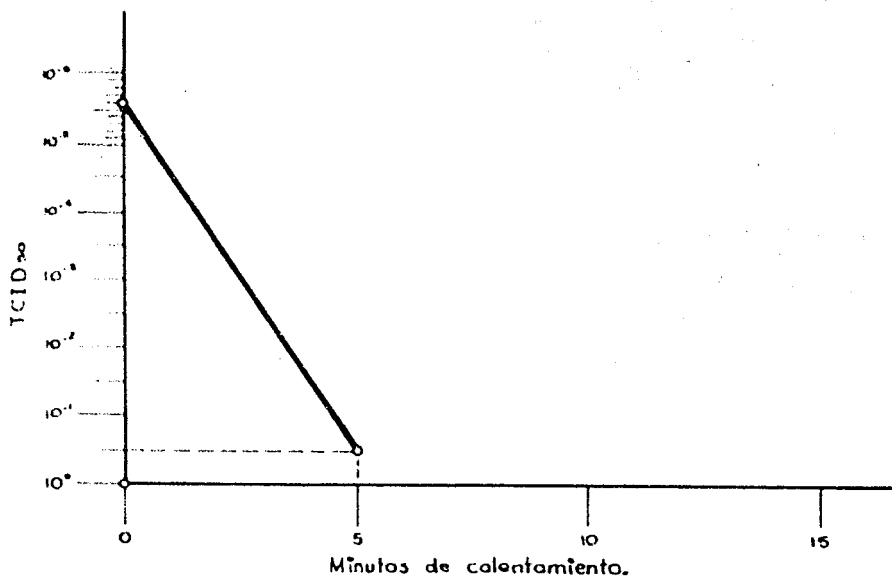


Figura 1.- Titulación de infectividad residual de una suspensión de poliovirus tipo I (cepa P2226) sujeta a una temperatura de 55°C en diferentes intervalos de tiempo. Suspensión de virus contenida en capilares en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

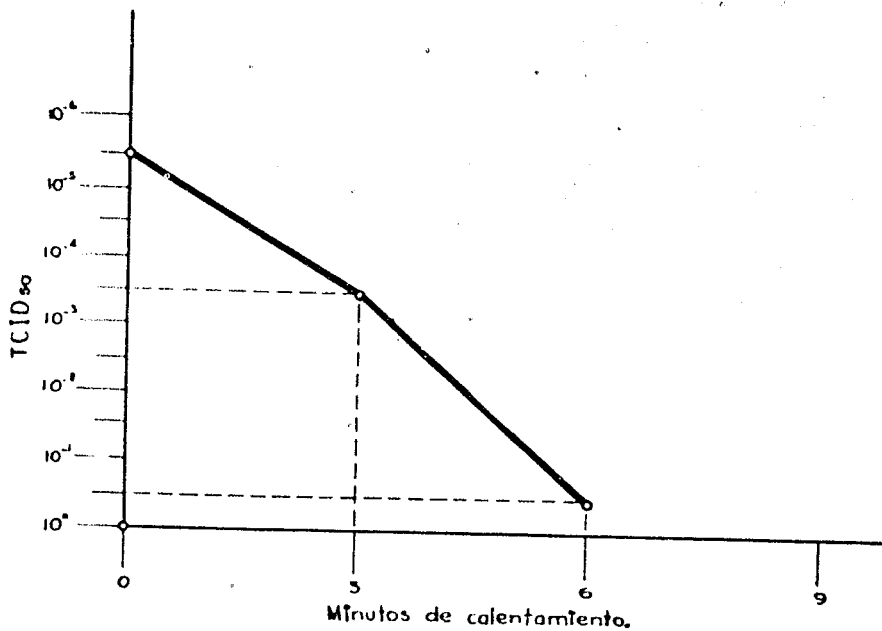


Figura 2.- Titulación de infectividad residual de una suspensión de poliovirus tipo I (cepa P2226) sujeta a una temperatura de 55° C en diferentes intervalos de tiempo. Suspensión de virus contenida en capilares en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

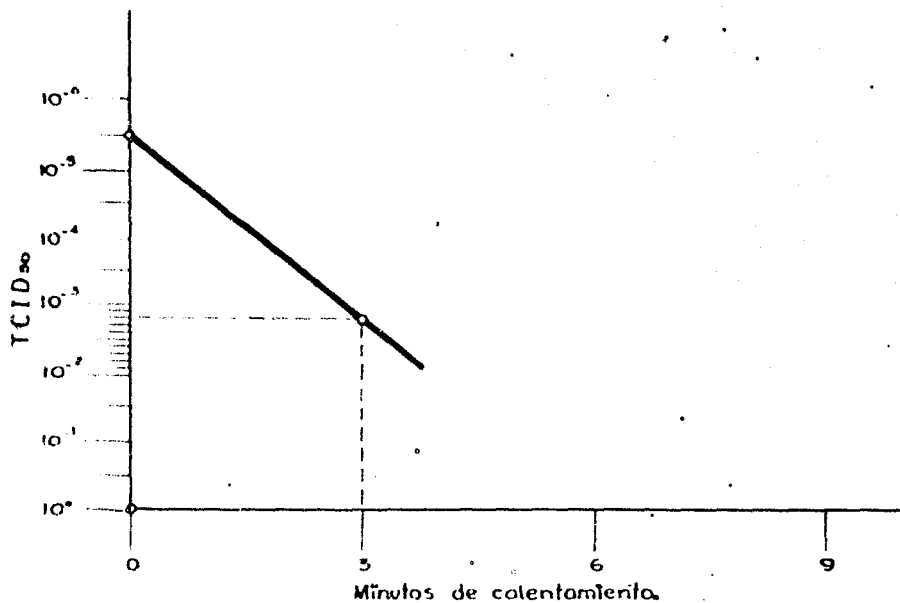


Figura 3.- Titulación de infectividad de una suspensión de poliovirus tipo 1 (cepa P 222b) sujeta a una temperatura de 55°C en diferentes intervalos de tiempo. Suspensión de virus contenida en capilares en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml.

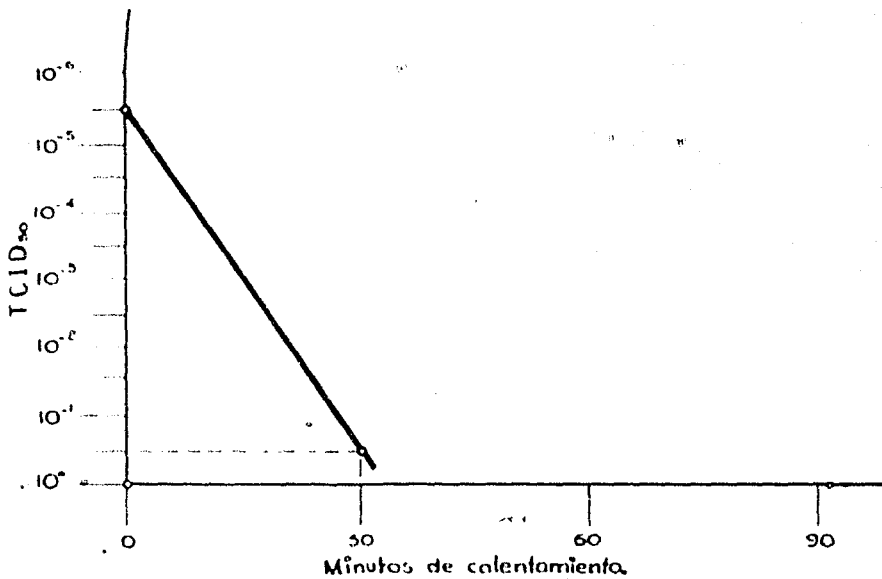


Figura 4.- Titulación de infectividad residual de una suspensión de poliovirus tipo I (cepa P 2226) sujeta a una temperatura de 55°C en diferentes intervalos de tiempo. Suspensión de virus contenida en ampollitas en volumen de 1.0 ml.

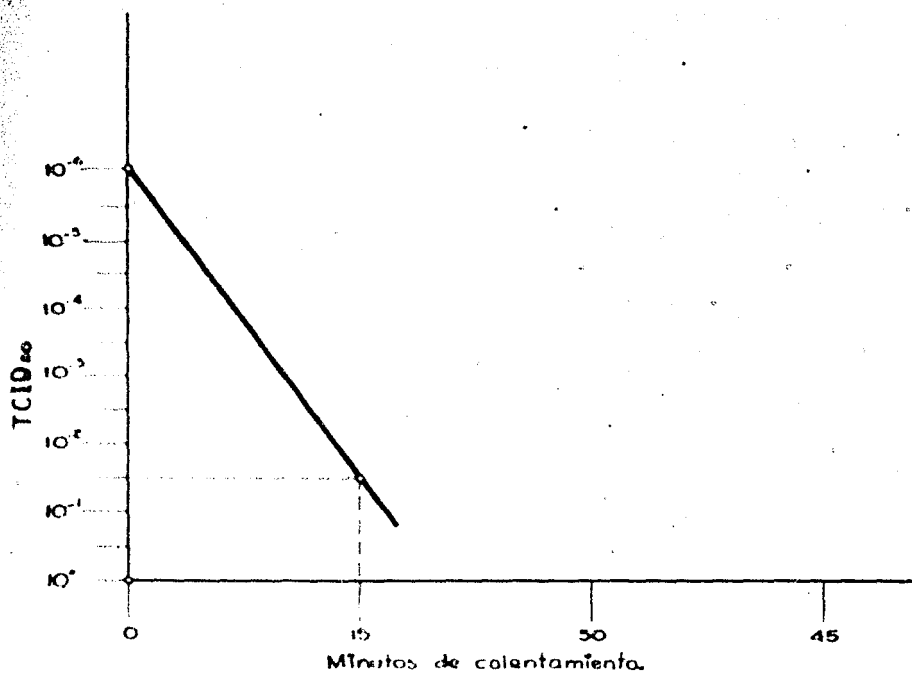


Figura 5.- Titulación de infectividad residual de una suspensión de poliovirus tipo I (cepa P 222) sujeta a una temperatura de 55°C en diferentes intervalos de tiempo. Suspensión de virus contenida en ampollitas en volumen de 1.0 ml.

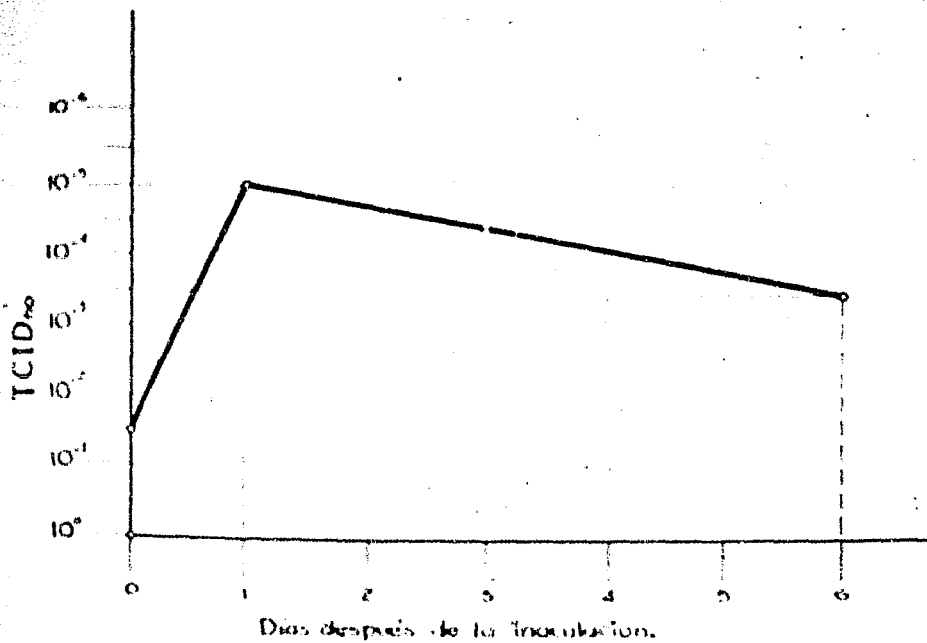


Figura 6.- Curva de reproducción de la copa No. 66 de poliovirus tipo 1 en cultivo de riñón de mono carabato. Titulaciones efectuadas en cultivo de riñón de mono cynomolgus.

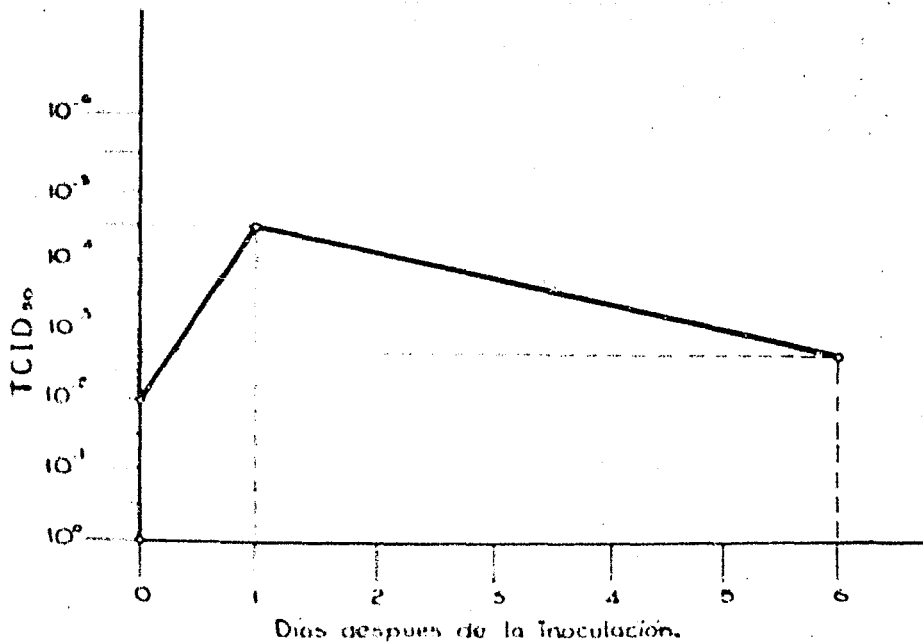


Figura 7.- Curva de reproducción de la cepa No. 9 de poliovirus tipo I en cultivo de riñón de mono sarahuato. Titulaciones efectuadas - en cultivo de riñón de mono cynomolgus.

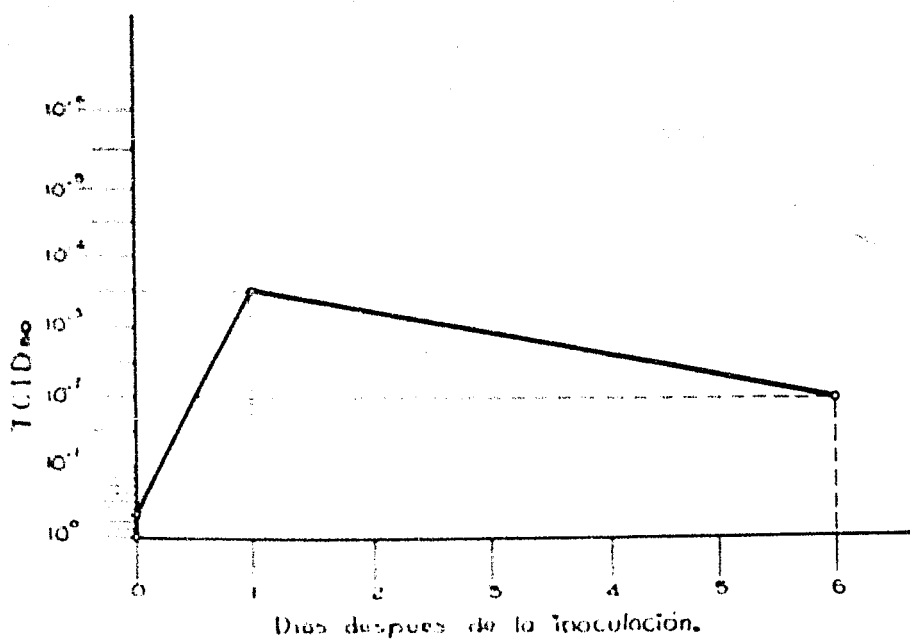


Figura 5.- Curva de reproducción de la cepa No. 16 de poliovirus tipo I en cultivo de riñón de mono sarahuato. Titulaciones efectuadas en cultivo de riñón de mono Cynomolgus.

B I B L I O G R A F I A

- Armstrong, C. 1939 The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat. Pub. - - Health Rep. 54:1719-1721.
- Dulbecco R., y Vogt, M. 1954 Plaque formation and isolation of - pure lines with poliomyelitis viruses. - - J. Exper.Med. 92:167-182.
- Endera, J.F., Weller, T. H. y Robbins, F. C. 1949 Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus - in cultures of various human embryonic tissues. Science 109:81-87
- Kaplan, A.S., y Melnick, J.L. 1955 Multiplication of virulent poliovirus in capuchin monkey kidney cultures without microscopically observed cytopathogenicity. Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. -- 90:562-565.
- Kaplan, A.S. 1955. The susceptibility of monkey kidney cells - to poliovirus in vivo and in vitro. Virology 1:377-392.
- Kessel, J.F., Pitt, C.F. y Koeko, E.P. 1951 Immunologic classification of poliomyelitis viruses.
II. Results obtained with the method for -- testing resistance of monkeys immunized - - with prototype viruses. Amer.J.Hyg. 54:205-210.

Melnick, J. L., y Wiordan, J. T. 1952. Poliomylitis viruses in tissue culture. IV. Protein-free nutrient media in stationary and roller tube cultures.

Proc. Soc. Exper. Biol. and. Med. 81:208- -
213.

Sabin, A.B., y Glinsky, P.E. 1936 Cultivation of poliomyelitis -- virus in vitro in human embryoni nervous - tissue. Proc. Soc. Exper. Biol. and. Med. - -
54:357-360

Salk, J.E., Youngner, J.S., Lewis, L.J., y Bennett, B.L. 1951 - - Immunologic classification of poliomyelitis viruses. IV. Results of Typing by neutralization of prototype viruses with antiserum produced by vaccinating monkeys with unknown strain and an adjuvant. Amer. J. Hyg. - - -
54:255-267.

Rodaniche, E. C. 1952. Susceptibility of certain species of Panamanian monkeys to the virus of acute anterior poliomyelitis. Amer. J. Trop. Med. and -- Hyg. 1:205-209.

The Committee on Typing of the National Foundation for Infantile Paralysis 1951. Immunologic classification of poliomyelitis viruses. I. A cooperative program for the typing of one hundred - - strains. Amer. J. Hyg. 54:191-204.

Youngner, J. S. 1954. Monolayer Tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of Trypan blue dispersed monkey kidney cells.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 85:202-205.

Youngner, J. S. 1956 Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. Fed. Proc. 15:624.