

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

U.M.

◆ *Cultivo en Tejido, del  
Virus de la Viruela  
Aviar*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

*Irma Mayoitia Macias*

---

MEXICO, D. F. 1961





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.*  
*con todo mi cariño y gratitud*

*A mis hermanos*

*Al Lic. Antonio Montes de Oca* //  
*compañero inseparable*

*Quedo altamente agradecida por  
la colaboración que me brindó  
el Sr. Dr.*

*Hubertus Fiege*

*director del Instituto Behring, al  
proporcionarme todos los medios  
para la realización de este trabajo*

*Al Sr. Dr.*

*Pablo Hurtado*

*por la valiosa ayuda e ideas que  
me brindó en la presente tesis*

*A la Srta Q. B. P.  
Frieda Islas Ocadiz  
con toda mi estimación.*

*Al Sr. Q. F. B.  
Oscar Amor  
bajo cuya dirección trabajé la  
presente tesis mi más sincero  
aprecio*

*A mis Maestros.*

*Al H. Jurado*

## CAPITULOS

- I.—Introducción
- II.—Material y Técnicas
- III.—Resultados
- IV.—Conclusiones
- V.—Resumen
- VI.—Bibliografía

El propósito esencial de esta tesis, fue lograr que el virus desarrollara en cultivo de tejido. Introduciendo esta técnica, en la elaboración de vacuna, ofreciera una mayor uniformidad en el desarrollo de virus, una eliminación en alto grado de las contaminaciones provenientes de embriones de pollo y facilitara además grandemente el trabajo respecto a los otros métodos.

## I.—INTRODUCCION

### *Generalidades de los virus.*

La palabra virus originalmente empleada por Pasteur y otros descubridores de la bacteriología, era aplicada indistintamente a cualquier agente infeccioso, fuera bacteria o de otra clase. Actualmente se aplica solamente a aquellos agentes productores de enfermedades identificadas específicamente como virus filtrables. (10).

La primera característica de los virus filtrables, reside en su facultad de atravesar los filtros de arcilla, porcelana o de otros materiales. Los virus filtrables en general son ultramicroscópicos y el uso de los microscopios ultravioleta y electrónico han hecho visibles diversas partículas víricas anteriormente invisibles.

El tamaño de los virus no discernibles por medio del microscopio, puede ser deducido por filtración, centrifugación y difusión.

El primer descubrimiento de que un virus ultramicroscópico o filtrable era la causa de una enfermedad animal, fue hecho por Loeffler en 1898.

La naturaleza de los virus se conoce mejor por lo que hacen que por lo que son. El criterio que prima generalmente para su identificación es su capacidad para producir cambios visibles en las células vivas, que se deben a las anomalías de forma y función, constituyendo esto la enfermedad.

El problema de si los virus son agentes vivos o inertes ha sido materia de discusión casi desde el principio. (7). La opinión general suponía a los virus como agentes vivos diminutos comparables a las bacterias, aunque más pequeñas. Todos estos conceptos pueden resumirse en dos criterios principales:

a).—Los virus son entidades vivas infinitamente pequeños, obligatoriamente parásitos y que dependen de las células del huésped.

b).—Los virus son agentes autocatalíticos inanimados e incapaces de crecer y multiplicarse autónomamente, pero sí capaces de provocar actividades metabólicas anormales en las células del huésped, uno de cuyos productos finales está constituido por la misma sustancia que estimuló la actividad anormal. Esta sustancia es capaz después de la destrucción de las células huéspedes, de repetir el mismo proceso en otras células lo que establecerá sus caracteres de propagación y desarrollo. Por supuesto era imposible demostrar cuál de los dos conceptos era el verdadero.

El aislamiento de una proteína cristalina, realizado por Stanley (18) incluso a pesar de repetidas cristalizaciones, retenía las propiedades del virus del mosaico del tabaco, no favoreció a quienes habían descartado la teoría autocatalítica en favor de la parásita, ya que es difícil pensar que un agente vivo puede comportarse de esta manera y sobrevivir a dichos procedimientos.

Por otro lado, debe recordarse que ningún virus patógeno para los animales ha sido aislado o purificado por el método de Stanley. Debido a la capacidad que tienen los virus de reproducirse se consideran seres vivos.

Con la ayuda del microscopio electrónico se han fotografiado muchos virus, demostrando que son corpúsculos de tamaño y morfología características. Se han obtenido fotomicrografías electrónicas de los corpúsculos elementales de numerosos virus. Unos son esféricos, otros oblongos, algunos son cuboides y otros muestran prolongaciones como las de los espermatozoides.

Los efectos citopatógenicos en las infecciones de virus en algunas enfermedades están ausentes, pero en otros afecta la morfología y metabolismo de las células. La modificación del metabolismo en las células indica la presencia de virus y los cambios en la morfología celular a veces son suficientes para identificar al virus que ha causado la enfermedad. Los efectos patológicos en las células

pueden ser totales, en este caso tenemos los efectos causados por el virus de la poliomielitis y otros. Los virus herpes B pseudorrábico produce cuerpos de inclusión intranucleares. Los virus encelalíticos producen muerte de algunas células y pycnosis de otras. Los Adenovirus presentan cambios en la morfología sin disminución del metabolismo celular. El virus del sarampión y otros producen degeneración espumosa.

Hablaremos más extensamente de las inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas ya que tienen enorme importancia en el diagnóstico de la enfermedad. (7). Estas varían de tamaño en las diferentes enfermedades y aún en diversos casos de la misma enfermedad, alcanzando hasta veinte o más micras de diámetro. Puede haber un cuerpo de inclusión, o varios dentro de una misma célula. Algunos son grandes y otros mucho más pequeños; a veces son completamente hialinos, pero la mayoría son granulares y algunos contienen corpúsculos internos bien teñidos. Algunos de los primeros investigadores consideran a los cuerpos de inclusión como los agentes infectantes, otros los tomaron por protozoarios y aún como agregados de parásitos diminutos incluidos en el material hialino. Cuando los experimentos de filtración demostraron que los virus de muchas enfermedades eran mucho más pequeños que las inclusiones observadas en los mismos, surgió la tendencia a considerarlos como productos de degeneración específicos de la substancia celular.

Sin embargo recientemente, se han acumulado datos indicadores de que algunas de éstas inclusiones contienen agregados de los corpúsculos elementales de los virus. (7).

Los virus muestran diferentes grados de especificidad de huésped y de tejido; muchos virus tienen una gran especificidad de huésped por ejemplo: el virus del cólera porcino que afecta sólo al cerdo; por otro lado hay virus como el de la rabia que afecta una gran cantidad de especies animales. Entre estos dos extremos está la mayoría de los virus que se limitan a un pequeño número de especies. Las bacterias también pueden ser atacadas por los virus filtrables, recibiendo el nombre de bacteriofagos, los cuales fueron descritos por vez primera por Twort 1915 (19) y D'Herelle 1917 (5).

La mayor parte de los virus presentan también afinidades tisulares definidas (7) un grupo afecta sólo a las células epiteliales; otros tienen afinidad por las células nerviosas y algunos atacan estructuras de origen mesodérmico. También hay virus pantrópicos que afectan varios tipos de células.

En una gran proporción de enfermedades por virus la inmunidad es absoluta y permanente (7), en esto difiere de la inmunidad en las enfermedades bacterianas que en general es relativa y transitoria. La inmunización pasiva por sueros específicos hiperinmunes son efectivos contra ciertas enfermedades por virus en los animales. Cuando se administra antes que se presente la infección o en el comienzo de la misma y antes de que el virus se haya diseminado resulta bastante efectivo. La protección conferida por dichos sueros casi siempre es completa y sólida pero de corta duración.

Los métodos de inmunización activa contra las infecciones por virus se agrupan en cuatro categorías (7):

- a).—El uso de virus virulento solo; cuando se usan virus virulentos, se obtiene la protección administrándolos generalmente por vía anormal;
- b).—El uso de virus virulento y antisuero;
- c).—El uso de vacunas a base de virus atenuado; y
- d).—El uso de virus inactivados.

Se ha demostrado también, que después de la curación de una infección vírica existen sustancias fijadoras del complemento. Varios autores han señalado el antagonismo que existe entre ciertos virus sin relación inmunológica entre sí pero que tienen en común la propiedad de afectar sobre todo al mismo grupo de células. Este antagonismo se manifiesta por el hecho de que la infección por uno de los virus, sirve para prevenir, ya sea parcial o totalmente, los efectos patogénicos de otro. Este fenómeno de interferencia es considerado en detalle por Vilches y Hirst 1947 (20), quienes citan muchos ejemplos.

Los virus parecen poseer el mismo grado de resistencia al calor, a la desecación y a los agentes químicos, que la forma vegetativa de

la mayoría de las bacterias. Todos son destruidos por temperaturas cercanas a cincuenta y cinco o sesenta grados centígrados en treinta minutos o menos. La desecación es fatal para muchos virus, aunque otros son muy resistentes. Sin embargo, aún los virus considerados muy susceptibles a la desecación, sobreviven por largos periodos, si es que la desecación es cuidadosa y completa (liofilización). Los virus por lo general no son alterados por el frío, ni aún intenso. La mayoría de los virus se conservan bien, si se les coloca en solución fuerte de glicerina (50 a 100 por ciento), contrario a los que sucede a las bacterias. Casi ningún virus resiste la putrefacción; las soluciones fuertemente alcalinas como lechada de cal al uno o dos por ciento los destruyen con más rapidez que las soluciones ácidas.

La identificación de los virus no están simple como la de las bacterias, pero se puede hacer con facilidad si el virus ha sido descrito previamente (10).

Una clasificación razonable del agente vírico, se puede basar en su poder patógeno para la especie que se conoce como susceptible y además sobre el periodo de incubación, los síntomas producidos en la incubación, los síntomas producidos en la infección artificial, el curso y las lesiones. La identificación absoluta ha de recoger además las pruebas inmunológicas, para lo cual se utilizan los antisueros específicos empleados en las pruebas de protección y las llamadas "pruebas de neutralización in vitro".

Se han dividido las enfermedades producidas por virus en animales en cuatro grupos: A, caracterizados por lesiones en la piel; grupo B, caracterizados por lesiones en el sistema nervioso central; grupo C, caracterizados por infecciones generalizadas o de tipo catarral; y grupo D, caracterizados por la formación de tumores.

Una cualidad esencial de todos los virus filtrables conocidos es su falta de multiplicación en medios sintéticos inertes, en contraste con las bacterias, protozoos y hongos (10). Los virus necesitan células vivas en el interior de las cuales llevan a cabo sus actividades metabólicas y se desarrollan puesto que esencialmente son parásitos obligados y de tal modo se perpetúan y multiplican constituyendo ésta una de sus principales características biológicas.

Los virus se pueden propagar en tres formas: Inoculación a huéspedes susceptibles, a embrión de pollo y a cultivos de tejidos. La multiplicación de un virus en el cuerpo animal, depende no sólo de la receptividad de la especie animal, sino también el método de inoculación y de la especial afinidad del virus por los tejidos.

El cultivo en embrión de pollo fue introducido por Woodruff y Goodpasture 1931 (23). En esta forma se han cultivado la mayoría de los virus que se desarrollan en las células epiteliales, así como un número considerable de otros virus que en general no se desarrollan en tejidos epiteliales. Los virus epiteliales casi nunca invaden el embrión, pero producen capas opacas en las membranas. El embrión, en tales casos puede continuar su desarrollo y aún empujar finalmente. En otros casos, el embrión es invadido por el virus y con desarrollo de lesiones en la membrana, o sin ellas en cuyo caso la muerte del embrión se presenta en tres o cuatro días. Es posible inocular el embrión de pollo por vía endovenosa, inyectando alguno de los grandes vasos del corion. También se puede introducir el inóculo directamente en el saco vitelino.

Es probable que el acontecimiento aislado más importante en la virología en los últimos años ha sido el empleo del cultivo de tejidos para saber si hay virus e identificarlos (10). Por regla general el método se emplea para la identificación de virus conocidos aislados de los individuos enfermos y para estudios morfológicos a diferentes estímulos, estudios metabólicos cuantitativos y la obtención de virus para la producción de vacunas.

Se han cultivado de manera artificial muchos virus animales, pero sólo en presencia de células susceptibles vivas (7). El mismo concepto que anteriormente se dijo respecto de la mejor elección de tejido se aplica en este método, el cual como indica su nombre consiste en mantener la vida o crecimiento de ciertos tejidos de modo artificial, sembrando en ellos la suspensión vírica con las precauciones asépticas correspondientes en bacteriología. En los tejidos propagados de esta manera se multiplican con gran facilidad la mayoría de los virus aunque no todos. Si los virus se cultivan en células diferentes a las del huésped natural, existe la posibilidad de obtener cepas modificadas pero que conservan su capacidad de reproducirse.

Los estudios del Wilhen Roux en 1885 y de los subsecuentes investigadores, Ljnnggren, Loeb, Jolly, Barrows, Carrel, etc., y los trabajos continuados por Fisher y otros ellos Parker, Morgan, White y Eagle establecieron las técnicas y medios para cultivar tejidos; citados por Paul John 1959 (16).

*Virus de la Viruela Aviar.*

Según la clasificación de Holmes (8) revisada más tarde por Packer y Merchant (15) el virus de la viruela aviar pertenece a:

Orden	Virales
Suborden	Zoophagineae
Familia	Borreliotaceae
Género	Borreliota
Especie	Avium

*Sinonimia.*—Viruela de pollo, aves, pájaros, epitelioma contagioso, cabeza con pústulas, molusco aviar, difteria variolosa de las aves y cáncer.

*Etiología.*—La viruela de las aves, se ha observado en especies aviaries desde tiempo inmemorial. Han presentado excelentes estudios de la enfermedad Goodpasture en 1928 (6) y Beaudette en 1949 (2), citados por Biester 1952 (3). El Agente causal de la viruela aviaria es un virus filtrable como se demostró primeramente por Marx y Sticker en 1902 (13) Carnwarth en 1908 (4) y otros comprobaron que a él se debe tanto la forma cutánea como la diftérica de la enfermedad. Hay al parecer cuatro variedades del mismo que causan la viruela entre las aves.

*Características de la enfermedad.*—Ataca a las aves jóvenes y adultas. La mortalidad es usualmente baja pero puede elevarse a 50%; además debe considerarse que hay un descenso en la producción de huevo y pérdida en peso de las aves.

La muerte ocurre a menudo en aves que tienen lesiones en el pico, faringe y órbitas; las infecciones de este tipo se llaman difteria aviar, ocasionalmente las lesiones pueden verse en las patas. El curso usual de la enfermedad es de tres a cuatro semanas.

*Cambios patológicos.*—Las lesiones son caracterizados por proliferación de estructuras superficiales epiteliales seguidas por degeneración. La capa basal del epitelio comunmente no es dañada a menos que ocurra una invasión bacteriana secundaria. Las células del área infectada llegan a hincharse y presentar vacuolas en las cuales pueden ser demostrados los cuerpos de Bollenger. La cicatrización tiene lugar comunmente sin la formación de escaras.

Goodpasture 1928 (6), informó que los cuerpos de inclusión de la viruela eran aproximadamente de un cuarto de micra y pueden verse fácilmente en el microscopio. Los experimentos de Woodruff y Goodpasture en 1929 (21), acerca de la naturaleza e infectividad de los cuerpos de inclusión de la viruela avaria presentaron pruebas concluyentes acerca del agente etiológico de la enfermedad.

En una publicación posterior Woodruff y Goodpasture en 1930 (22), demostraron que un cuerpo de inclusión puede contener hasta veinte mil cuerpos elementales cada uno de los cuales fue capaz de provocar la enfermedad en las aves susceptibles. Estos corpúsculos se les llamó corpúsculos de Bollenger.

*Diagnóstico.* — La presencia de lesiones cutáneas típicas de la infección variolosa en los pollos, de ordinario justifica el diagnóstico de la enfermedad. No se puede hacer tan fácilmente el diagnóstico de la enfermedad cuando hay llagas en el pico o lesiones parecidas a la del catarro con sus síntomas respectivos. Puede emplearse varias pruebas de diagnóstico como por ejemplo pruebas de infectividad, de protección, examen microscópico de las lesiones y pruebas serológicas. Con las pruebas de infectividad puede ser necesario utilizar huéspedes tanto heterólogos como homólogos para lograr un diagnóstico exacto o preciso del tipo de virus presente en el ave, la presencia de virus de la viruela aviar puede demostrarse fácilmente mediante la aplicación de una suspensión de material de la piel de los pollos susceptibles mediante una escarificación en la cresta. Si hay virus en el material sospechoso se desarrollarán en el pollo las lesiones cutáneas típicas de la enfermedad en un lapso de cinco a siete días.

Las pruebas de protección o inmunidad con pollos, pueden em-

plearse simultáneamente con respecto a las pruebas de infectividad y microscópicas. La exposición de aves tanto inmunes como susceptibles al virus de la viruela por métodos antes descritos dará por resultado la refractividad en el ave inmune y el desarrollo de lesiones cutáneas típicas en la susceptible. El ave originalmente sospechosa de viruela que se restablezca de la infección puede ser sometida a prueba de inmunidad con algún virus ya conocido de la viruela aviaria.

*Resistencia.*—El virus de la viruela de las aves es muy resistente a la desecación. En las costras secas separadas de las regiones epiteliales la virulencia permanece intacta por muchos meses. En el suelo sujeto a condiciones ordinarias la viabilidad del virus no pasa de unas semanas. La enfermedad tiende a aparecer año tras año, en los mismos lugares. No se sabe si el virus permanece viable en los periodos intermedios.

El virus muere a 60° C. en 8 minutos o a 56°C. en 30 minutos. La viabilidad del virus se mantiene por dos años cuando se almacena seco a 0°C. o a 4°C.

Las siguientes sustancias químicas inactivan al virus en 10 minutos.

1-500 Na OH, 1-1000 de cristal violeta, alcohol al 70%; 1-400 de cresol. El Fenol a concentración de 3% lo mata en 30 minutos pero no en 10 minutos; el aldehído fórmico ni aún en 20 minutos. Se conserva por periodos largos en glicerina al 50%.

*Transmisión.*—Se supone que la viruela aviaria es transmitada sobre todo por contacto directo de ave a ave por medio de heridas en las peleas y las hechas por picotazos de las aves entre ellas. Esta enfermedad también puede diseminarse por las picaduras de los mosquitos (Kligler, Muckenfuss y Rivers) 1929, (11), Matheson, Brunett y Brody 1930 (14).

La inoculación artificial intramuscular o intravenosamente puede a veces causar una infección.

9

**Inmunidad.**—Las aves recobradas quedan sólidamente inmunes. En las granjas en que la enfermedad se ha presentado por muchos años, sólo se observa en las aves jóvenes. En gallineros no infectados previamente, la enfermedad ataca a las aves de todas edades; la inmunización de los planteles de aves se lleva a cabo en todas las regiones donde existe la viruela. Se usan dos métodos, uno de ellos consiste en el empleo de virus virulento de viruela de gallina y el otro de virus de viruela de pichón. Ambos métodos dan buenos resultados.

*Cultivo de los virus de la viruela aviar.*—El virus de la viruela aviar sólo puede cultivarse en presencia de células vivas de huéspedes susceptibles. Como ya se indicó estos requisitos pueden ser proporcionados por el huésped susceptible, por huevos embrionados y por cultivo de tejidos como demostraremos en el presente trabajo. El cultivo del virus de la viruela de las aves en el huésped puede efectuarse mediante la aplicación del virus a la cresta escarificada de un pollo y recogiendo las costras.

Woodruff y Goodpasture en 1931 (23) cultivaron con éxito el virus de la viruela aviar en la membrana corioalantoidea. Donde produce engrosamiento, edema y necrosis de la membrana, pero el virus usualmente no es letal para el embrión, cultivándolo también en la yema y en el embrión de pollo.

Teniendo en cuenta todos estos estudios se pensó en hacer que este virus se adaptara a reproducirse en cultivo de tejidos. Esta técnica ofrece muchas ventajas, principalmente desde el punto de vista de producción de la vacuna, que generalmente se produce a partir de virus que se cultiva en huevos embrionados.

La técnica consiste en la digestión triptica de (16) los tejidos embrionados, que luego se les hace crecer en presencia de medio de cultivo enriquecido, adicionado con antibióticos. Una vez desarrolladas las células se inoculan con el virus y éstos se multiplican, causando lesiones en el interior de las células. Estos virus así desarrollados se resiembran en las mismas condiciones tratando de adaptarlos a estos cultivos.

## II.—MATERIAL Y TECNICAS

### *Consideraciones generales. (16)*

Para obtener los mejores resultados en el desarrollo del virus en cultivo de tejidos, debemos tener presente muchos puntos de vista, ya que: los medios de cultivo de las células y de los virus son altamente nutritivos no solamente para éstos, sino también para bacterias y hongos. La mayoría de los microorganismos tienen un ritmo de crecimiento mucho más rápido que las células y con frecuencia producen toxinas mortales para ellos. Por lo tanto muy importante en la técnica es evitar toda contaminación.

Tenemos como fuentes de contaminación las siguientes:

- I.—El material.
- II.—El medio de cultivo.
- III.—El tejido empleado.
- IV.—El ambiente.
- V.—El operador.

Antes que nada, es esencial asegurarse de que no se introduzcan bacterias y hongos con el tejido o con el material, para lo cual el primero debe obtenerse asépticamente esterilizándose después. Esto último puede hacerse eficazmente con antibióticos y el segundo en el horno o autoclave según convenga o por desinfección química. Es conveniente un cuarto aséptico con aire estéril, es decir, exento de polvo en las mesas las que deben desinfectarse con alcohol; no deberán abrirse las puertas y se tendrá prendida constantemente la luz ultravioleta. Por otra parte, al quedar eliminadas las anteriores fuentes de contaminación queda el operador mismo con su respiración y polvo que levante con sus movimientos. Para eliminarse los gérmenes deben aplicarse las técnicas siguientes:

- I.—Destrucción física por calor seco, húmedo y radiación.

II.—Destrucción química: antisépticos, antibióticos.

III.—Remoción física: filtración, centrifugación y lavado.

*Radiaciones.* — La luz ultravioleta se emplea en esterilización, pero debe recordarse que puede producir cambios químicos en las sustancias irradiadas.

Antisépticos: Alcohol, éter.

Antibióticos: Se debe hacer notar que muchos antibióticos son muy tóxicos para las células y en algunos casos los grados de toxicidad se acercan al nivel efectivo. El más útil es la penicilina de veinte a cincuenta unidades y estreptomycin cincuenta miligramos por mililitro. Los hongos pueden inhibirse con micostatina a concentración de veinte miligramos. Esta es inestable y se descompone casi por completo después de 24 horas a 37°C. y el producto de oxidación es algo tóxico.

Además del empleo de rutina de los antibióticos en los medios de cultivo: los antibióticos pueden emplearse en concentraciones mucho más elevadas para esterilizar tejidos contaminados antes de su explantación.

*Detergentes.*—Los detergentes se emplean muy extensamente para la limpieza del material de vidrio; pero es difícil quitarlos; no hay que olvidar que muchos detergentes son tóxicos para las células.

Respecto a los medios de cultivo es de mucha importancia controlar el pH. Esencialmente los medios están constituidos por solución salina equilibrada, aminoácidos, oxígeno, vitaminas y proteínas de suero.

*Factores que deben tomarse en cuenta al preparar medios de cultivo.* — *Solubilidad de los materiales.* — Algunas sustancias químicas son muy poco solubles como la tirosina, que sólo es soluble en solución ácida para lo cual el ácido debe mezclarse en las últimas etapas para que no cause daño a las otras sustancias. Los lípidos deben solubilizarse en soluciones alcohólicas. También tiene que

agregarse un detergente no tóxico (Tween 80) para estabilizarse las soluciones.

*Compatibilidad de materiales.* — Al combinar ciertos materiales debe recordarse que juntos pueden reaccionar para producir sustancias enteramente diferentes. Esto puede ocurrir principalmente al calentarse las soluciones por ejemplo la glucosa y el ácido ascórbico corren peligro de destruirse por el calor en presencia del álcali.

*Pureza de materiales.* — Es necesario darse cuenta de que aún las sustancias químicas más puras tiene huellas de impureza que pueden interferir en el desarrollo de las células.

*Inestabilidad de los compuestos.* — Algunos compuestos inestables es necesario almacenarlos en estado seco y en frío. Es importante preparar medios frescos o en caso de almacenarse sería a temperaturas muy bajas. Puede aconsejarse preparar soluciones parciales que finalmente se combinan para completar el medio.

El uso de la congelación en el almacenaje de material es ventajoso en lo que respecta al virus, pero algunos autores opinan que para el cultivo de tejidos tiene un efecto nocivo lacerando las células por la formación de cristales de hielo; se recomienda para evitar ésto el uso de glicerol y una congelación lenta.

Solución salina balanceada de Hanks (9).

Solución "A"

Cloruro de sodio . . . . .	160 g.
Cloruro de potasio . . . . .	8 g.
Sulfato de magnesio . . . . .	2 g.

Todas estas sustancias se disuelven en aproximadamente 800 ml. de agua bidestilada.

Cloruro de Calcio . . . . . 2.8 g.

Que se disuelve en aproximadamente 100 ml. de agua bidestilada.

Se mezclan ambas soluciones y se afora a 1000 ml. con agua bi-destilada; se añaden 2 ml. de cloroformo como preservativo, se tapa y se guarda en el refrigerador.

Solución "B"

Fosfato de Sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3.04 g.
Fosfato de Potasio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.20 g.
Dextrosa	20.00 g.

Todas estas sustancias se disuelven en aproximadamente 800 ml. de agua bidestilada. Se añaden 100 ml. de rojo de fenol al 0.4% y se afora a 1000 ml. con agua bidestilada. Se añaden 2 ml. de cloroformo como preservativo, se tapa y se guarda en el refrigerador.

La solución de Hanks se prepara mezclando:

- Un volumen de solución "A".
- Un volumen de solución "B".
- 18 volúmenes de agua bidestilada.

Se esteriliza en autoclave a 9 lb. de presión durante 10 minutos. Se guarda en el refrigerador. Inmediatamente antes de usarse, se añade 0.5 ml. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 1.4% para cada 20 ml. de solución de Hanks. El PH. debe ser de 7.4 a 7.6 (generalmente es necesario adicionar un poco más de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Solución de tripsina al 0.25%	2.50 g.
Tripsina	1000 ml.
Solución de Hanks, C.b.p.	1000 ml.

Se ajusta el pH a 7.4 - 7.6 con solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Medio de cultivo de Melnik (9).—Con 20% de suero de caballo. Se ajusta el pH a 7.4-7.6 con solución de No. 2603.

Hidrolizado de lactoalbúmina	5 g.
Suero de caballo (inactivado)	200 ml.
Penicilina G Potásica cristalina	1 ml. (100 U.O./ml.)
Sulfato de dihidro estreptomycinina cristalina	1 ml. (0.1 mg/ml.)
Solución de Hanks, C.b.p.	1000 ml.

Se disuelve al hidrolizado de lactoalbúmina en la solución de Hanks, se añade el suero de caballo inactivado y se adicionan después los antibióticos.

Se ajusta el pH. a 7.5 con solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 1.4%.

Medio de cultivo 199. — De Morgan, Morton y Parker (1950) (16)

	Miligramos por 1000 ml.		Miligramos por 1000 ml
L — Cistina	20.0	Tiamina	0.010
L — Arginina HCL	70.0	Riboflavina	0.010
L — Histidina HCL	20.0	Piridoxal	0.025
L — Lisina HCL	70.00	Piridoxina	0.025
LD — Triptofano	20.0	Niacina	0.025
DL — Fenilalanina	50.0	Niacinamida	0.025
DL — Metionina	20.0	Pantotenato de Calcio	0.01
DL — Serina	50.0	Biotina	0.01
DL — Treonina	50.0	Acido Fólico	0.01
DL — Leucina	120.0	Colina	0.50
DL — Isoleucina	40.0	Inositol	0.05
DL — Valina	50.0	Acido p-Aminobenzóico	0.05
DL — Acido Glutámico		Vitamina A	0.10
Monohidratado	150.0	Calciferol (Vit. D. D2)	0.10
DL — Acido Aspártico	60.0	Menadiona (Vit. K)	0.10
DL — Alfa Alanina	50.0	Fosfato disódico de Alfa-	
L — Prolina	40.0	tecoferol (Vit. E)	0.01
L — Hidroxiprolina	10.0	Acido ascórbico	0.05
Glicina (Acido		Glutatione	0.5
aminoacético)	50.0	Coleterol	0.2
Cisteina	0.1	Tween 80	20.0
Adenina	10.0	Acetato de Sodio	50.0
Guanina HCL	0.3	L-Glutamina	100.0
Xantina	0.3	Adenosin Trifosfato	10.0
Hipoxantina	0.3	Acido Adenilico	0.2
Timina	0.3	Nitrato Férrico	0.1
Uracilo	0.3	Ribosa	0.5
		Desoxiribosa	0.5

Este medio también contiene una solución salina balanceada (17).

### Técnica para teñir los frotis de células cultivadas. (12)

Todavía no se ha llegado a una conclusión clara en lo que respecta al mecanismo por el cual los tejidos o las células se tiñen cuando son expuestas a determinados colorantes.

Hubo una época en que se estimó que la afinidad colorante de los tejidos dependía de un fenómeno químico basado en la selectividad de las sustancias básicas por los colorantes ácidos y viceversa. Hoy tal explicación no puede ser aplicada a todos los casos, pero hay razones de peso que demuestran que tal proceso es a veces físico y que la capilaridad y las ósmosis juegan importante papel en la penetración de los colorantes en los tejidos. La adsorción puede explicar muchos de los fenómenos de la coloración diferencial. Esta es una propiedad inherente a un cuerpo sólido, el cual atrae minúsculas partículas de materias contenidas en el líquido circundante. Dichas partículas pueden estar constituidas por iones. El hecho de que la capacidad de adsorción puede estar influida en la presencia de otros iones y de que la reacción de las soluciones ejerza un marcado efecto en tal fenómeno, explica la afinidad colorante, de determinados elementos celulares y la variación en la capacidad colorante según su proporción de sal y la influencia de la concentración de hidrogeniones sobre el color asumido por el tejido cuando éste es expuesto a la acción de colorantes ácidos y básicos a la vez.

#### Hematoxilina (Harris).

Hematoxilina . . . . .	1 g.
Alcohol . . . . .	10 ml.

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol.

Agua destilada . . . . .	200 ml.
Alumbre amónico o Potásico . . . . .	20 g.

El alumbre debe ser disuelto en agua con ayuda del calor. Verificada esta operación, se procede a añadirla a la solución alcohólica

de hematoxilina. Se calienta el reactivo hasta la ebullición y se añaden 0.5 g. de óxido mercúrico. Tan pronto como la mezcla presente color púrpura obscuro se enfria rápidamente, introduciendo el recipiente en agua fría. Una vez enfrida está lista para su uso siendo especialmente recomendable para los tejidos fijados con el líquido de Zenker. La adición de 8 ml. de ácido acético glacial favorece la tinción de los núcleos.

*Eosina.*—La eosina Y (amarillenta) es uno de los más valiosos colorantes plasmáticos. Se considera hidrosoluble, pero también se disuelve en alcohol.

Se prepara del siguiente modo:

Eosina Y (85 % de contenido en colorante) . . . . .	1.0 g.
Alcohol etílico (al 95 por 100) . . . . .	25.0 ml.
Agua destilada . . . . .	75.0 ml.
Los cortes se tiñen de 30 a 60 segundos.	

*Técnica para fijar las células.*

Entiéndase por fijación el proceso por el cual se evita la desintegración de los tejidos o cualquier otro cambio por autodigestión. Aun no se ha podido hallar un agente ideal de fijación. Muchos producen retratación de los tejidos.

Líquido de Zenker. . . . .	2.5 g.
Bicromato potásico . . . . .	8.0 g.
Cloruro Mercúrico . . . . .	100.0 ml.
Agua destilada . . . . .	

Se añade 5 por 100 de ácido acético glacial antes de usarse.

El cloruro mercúrico no se disolverá del todo, pero la cantidad expresada dará a la solución la concentración requerida. Se fijan trozos finos de tejido (de menos de 5 mm) en diez volúmenes de reactivo, durante diez a doce horas. Es muy conveniente colocar en el fondo de las placas una fina placa de algodón o un pedazo de papel, para que el tejido no se ponga en contacto con el cristal. Des-

pués de la fijación lávese el tejido durante 24 horas en agua corriente. Este reactivo conserva bien la estructura del tejido. La fibrina, los filamentos y los detalles nucleares aparecen nítidamente definidos cuando el mencionado proceso de fijación va seguido de coloración con la hematoxilina fosfotúngica. Los tejidos fijados por este procedimiento requieren que la hematoxilina actúe por más tiempo que los fijados por otros reactivos.

*Mezcla picro-Formol-acética.*—Esta mezcla es bien conocida en histología debido a que conserva los detalles citológicos de manera excelente; no obstante, su empleo impide una buena tinción con ciertos colorantes nucleares, cuando se usa el líquido de Flemming o el de Helly.

Líquido de Bouin.

Solución acuosa saturada de ácido picrico.....	75 partes.
Acido acético glacial . . . . .	5 partes.
Formalina (al 40 por 100).....	25 partes.

Existe poco peligro de exceso de fijación de los tejidos; el líquido penetra rápidamente.

Mc Clung y otros han observado que la adición de urea al líquido de Bouin ayuda mucho a observar los más finos detalles celulares. La siguiente modificación de Allen es recomendable:

Solución acuosa saturada de ácido picrico.....	75 partes.
Formalina (al 40 por 100) . . . . .	15 partes.
Acido acético glacial . . . . .	10 partes.
Urea . . . . .	1 parte .

Es bueno añadir a esta fórmula una parte de ácido crómico, cosa que debe hacerse inmediatamente antes de usarse la solución, ya que el formol reduce al ácido crómico dando lugar a un color verdoso. Otras coloraciones o formación de precipitados que pueden producirse, radican en la impureza de los reactivos e inutilizan el líquido.

Mezcla alcohol-ácido.

Alcohol de 96°C. . . . .	50 ml.
Agua destilada . . . . .	50 ml.
Acido Clorhidrico concentrado . . . . .	.25 ml.

*Lavados.*—Los tejidos después de fijación con alcohol o formol no necesitan ser lavados con agua. Las preparaciones fijadas en soluciones que contienen sales de cromo deben lavarse en agua corriente durante 24 horas. Las fijadas con ácido picrico corren el peligro de macerarse si se dejan demasiado tiempo en agua por lo tanto el lavado en estos casos debe ser muy breve.

*Técnica de coloración celular.* — Con objeto de obtener fácilmente las células de las botellas, se introduce un cubre-objetos en éstas antes de que se siembren con las células.

Con unas pinzas estériles se extrae el cubre-objetos (que tiene adheridas las células) de la botella inoculada con el virus y se procede a colorearlo para ver las lesiones causadas por el virus.

Se introduce el cubre-objetos en un tubo de ensaye y se agrega el líquido fijador de Zenker (previamente filtrado) hasta tapan el cubre-objetos; se deja 24 horas. Al cabo de este tiempo se le tira el líquido de Zenker y se enjuaga con agua de la llave durante unos minutos; después se agrega la hematoxilina de Harris (previamente filtrada también) hasta cubrir el cubre-objetos, dejándola permanecer durante 5 minutos; se lava con agua de la llave hasta que ésta sea clara; después se decolora con la mezcla de alcohol ácido durante 15 segundos y se lava con agua de la llave hasta que tome color azul; se tiñe con la solución de eosina durante 2 minutos y se enjuaga con agua de la llave hasta que salga clara; se agrega alcohol de 96° dejándolo actuar durante 2 minutos; posteriormente alcohol absoluto durante 2 minutos y por último xilol durante 2 minutos. Una vez teñido el cubre-objetos se monta en un porta-objetos usando bálsamo de Canadá y se lleva a la estufa durante unas horas hasta su endurecimiento.

### *Técnica para la obtención de células de embrión de pollo (1)*

Todas las manipulaciones y material usado se efectúan bajo las máximas condiciones de asepsia y esterilidad; las soluciones usadas deben usarse a 37°C.

1.—Partiendo de huevos embrionados de once días, que deberán desinfectarse con alcohol a 70%, se corta sobre el saco aéreo de éstos y se extraen asépticamente los embriones cortándoles las patas y el pico.

2.—Se colocan los embriones en una caja de Petri y se lavan con solución salina isotónica con el objeto de arrastrar la mayor cantidad de sangre.

3.—Se introducen en un vaso de precipitados y se cortan en pedazos pequeños con ayuda de tijeras curvas.

4.—Se agrega solución salina balanceada de Hanks para quitar la sangre interna y membrana externa y se deja sedimentar.

5.—Se extrae el líquido de lavado por medio de un sifón.

6.—Se corta el tejido nuevamente en pedazos más finos.

7.—Se lava nuevamente con solución de Hanks, dejando sedimentar.

8.—Nuevamente se extrae el líquido de lavado con el sifón.

9.—Se corta en pedazos más pequeños el tejido.

10.—Se lava con solución de Tripsina al 0.25% y con un pH. aproximado de 7.4 a 7.6.

11.—Se extrae el líquido.

12.—Se vacía el contenido del vaso a un matraz conteniendo un agitador magnético.

13.—Se agregan aproximadamente de 40 a 50 ml. de solución de tripsina.

14.—Se lleva a la estufa a 37°C. durante una hora colocando el matraz sobre el aparato inantado con el objeto de que se realice la digestión triptica.

15.—Se filtra por una gasa de 2 a 3 mallas a un matraz.

16.—Se centrifuga el filtrado a 800 ó 1000 revoluciones por minuto.

17.—Se decanta el sobrenadante y el paquete celular es medido.

18.—Se hace la cuenta celular utilizando la cámara de Neubauer y se resuspende el sedimento en una cantidad suficiente del medio de Melnick, hasta obtener una suspensión de  $55 \times 10^4$  células por ml.

19.—Se distribuye en botellas de superficie amplia, procurando que el líquido alcance una altura de 1 a 2 cm.

20.—Se incuban estas botellas a 37°C. durante 72 horas o más, hasta que las células se hayan adherido a la superficie de la botella.

#### *Técnica para la inoculación del virus.*

*Cadena vertical* (Esq. 1).—*Inóculo*.—Virus de la viruela var. cepa Buckenau con  $ID_{50}$  en membrana corioalantoidea de huevos incubados 11 días, igual a 0.2 ml. de dilución  $1 \times 10^{-4}$ .

#### *Técnica de siembra de: Botella-Huevo-Botella.*

1.—El líquido de las botellas en que se desarrollaron las células se desecha, para después inocular el virus en las células.

2.—A las botellas con células se inocula con 1 ml. del virus de la cepa original; equivalente a 50 000  $ID_{50}$ .

3.—Se agrega a las botellas ya sembradas el medio de cultivo para que se reproduzca el virus, empleándose para ello, el medio 199.

4.—Una vez efectuados los pasos anteriores, se incuban las botellas a 37°C. durante un tiempo de 96 horas.

5.—Transcurridas las 96 horas se recoge el líquido y las células que se desprenden por medio del raspado con un instrumento especial.

6.—Se tritura lo anterior.

7.—Se centrifuga aproximadamente a 1500 revoluciones por minuto, en centrifuga refrigerada a la temperatura de 0°C. durante 20 minutos.

8.—Se decanta el líquido.

9.—Se inoculan los huevos embrionados de 11 días en la membrana corioalantoidea la cantidad de 0.2 ml. del líquido decantado.

10.—Incubar el huevo durante 6 días a 37°C.

11.—Abrir el huevo por la parte inoculada para observar el número de las lesiones en la membrana corioalantoidea causadas por el desarrollo de los virus.

12.—Se cosechan las membranas en cajas de Petri.

13.—Se lavan con solución salina.

14.—Se trituran en un mortero con arena de cuarzo.

15.—Se centrifugan las membranas aproximadamente a 1500 revoluciones por minuto en la centrifuga refrigerada a 0°C. durante 20 minutos.

16.—Se desecha el sedimento.

17.—Se agrega por cada ml. de líquido los siguientes antibióticos: 100 U.O. de penicilina y 1 mg. de estreptomycinina.

18.—Se dejan actuar los antibióticos durante dos horas a la temperatura del laboratorio.

19.—Se inoculan las botellas con virus nuevamente.

#### *Cadena Horizontal.*

1.—El pase de huevo a la primera botella de esta cadena, se hace como en el pase anterior.

2.—Se pasa de botella a botella 1 ml.

3.—Se incuban 96 horas a 37°C.

#### *Técnica para la comprobación del crecimiento del virus en botella.*

El crecimiento de virus se comprueba en huevo.

1.—El líquido de la botella donde se desarrolló el virus, junto con las células que son desprendidas, se pasa a un tubo; se sigue la misma técnica como para hacer el pase de botella a huevo y se observa el número de lesiones en la membrana corioalantoidea.

#### *Técnica para la determinación de la dosis infectante en embrión de pollo.*

Se inoculan los huevos con la técnica anteriormente dicha en la forma siguiente:

Virus sin diluir la cantidad de 0.2 ml. a 6 huevos.

Virus diluido la cantidad de 0.2 ml. a 6 huevos.

Diluciones probadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024.

Se incuban los huevos durante 6 días a 37°C.

Se abren los huevos para observar las lesiones producidas por el virus.

*Técnica para determinar el grado de virulencia en aves.*

Las cepas original y modificada se inoculan en la cresta de pollos (de la misma edad); ésto se llevó a cabo escarificando la cresta, y luego con un pincel aplicando las cepas sin diluir. Se observaron 6 días al cabo de los cuales se ve el grado de reacción.

*Técnicas para la determinación de la potencia de sueros de aves vacunadas.*

*Técnica 1.*

1.—El suero se obtuvo a los 21 días de las aves que habían sido inoculadas en la cresta y que habían presentado respuesta.

2.—Se hizo reaccionar durante 30 minutos a la temperatura del laboratorio 0.1 ml. de la cepa sin diluir con 0.1 ml. de suero sin diluir y a las diluciones 1:5, 1:10, 1:100 de la siguiente manera:

Suero de gallina inmune: (S <sub>1</sub> ) con cepa original: (C <sub>1</sub> )	Suero de gallina inmune: (S <sub>1</sub> ) con cepa modificada: (C <sub>2</sub> )
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:1	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:1
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:5	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:5
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:10	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:10
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:100	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:100
Suero de gallina inmune: (S <sub>2</sub> ) con cepa original: (C <sub>1</sub> )	Suero de gallina inmune: (S <sub>2</sub> ) con cepa modificada: (C <sub>2</sub> )
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:1	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:1
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:5	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:5
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:10	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:10
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:100	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:100

C<sub>1</sub> = Cepa original  
C<sub>2</sub> = Cepa modificada

S<sub>1</sub> = Suero de la cepa original  
S<sub>2</sub> = Suero de la cepa modificada.

Y se hizo reaccionar cada uno de los sueros y cada una de las cepas en forma cruzada.

3.—Se agregó 100 U. de penicilina por ml. y 1 mg. de estreptomicina por ml.

4.—Se dejan actuar los antibióticos durante una hora a temperatura del laboratorio.

5.—Las mezclas se inoculan cada una de ellas en 4 huevos.

6.—Se inocularon 4 huevos como testigos de cada cepa (sin suero) a las cantidades de 0.1 y 0.2 respectivamente como control y para punto de referencia del desarrollo relativo del virus.

7.—Se incuban los huevos 6 días a 37°C.

8.—Se abren los huevos para comparar los grados de desarrollo y ver hasta que diluciones de los sueros se neutralizaron las cepas.

## Técnica 2.

Se siguieron los mismos pasos que en la técnica 1, sólo que este experimento se llevó a cabo con diluciones de las dos cepas hasta 1:1000 como se indica en el siguiente cuadro:

"A" Suero de gallina inmune S <sub>1</sub> con cepa original C <sub>1</sub>	"B" Suero de gallina inmune S <sub>1</sub> con cepa modificada C <sub>2</sub>
S <sub>1</sub> + C <sub>1</sub> 1:1000	S <sub>1</sub> + C <sub>2</sub> 1:100
S <sub>1</sub> + C <sub>1</sub> 1:100	S <sub>1</sub> + C <sub>2</sub> 1:10
S <sub>1</sub> + C <sub>1</sub> 1:10	S <sub>1</sub> + C <sub>2</sub> 1:5
S <sub>1</sub> + C <sub>1</sub> 1:5	S <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:1
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:1	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:5
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:5	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:10
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:10	C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub> 1:100
C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub> 1:100	
"C" Suero de gallina inmune S <sub>2</sub> con cepa original C <sub>1</sub>	"D" Suero de gallina inmune S <sub>2</sub> con cepa modificada C <sub>2</sub>
S <sub>2</sub> + C <sub>1</sub> 1:100	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:1
S <sub>2</sub> + C <sub>1</sub> 1:10	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:5
S <sub>2</sub> + C <sub>1</sub> 1:5	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:10
S <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:1	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:100
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:5	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:1000
C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub> 1:10	C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub> 1:10000

C<sub>1</sub> = Cepa original  
C<sub>2</sub> = Cepa modificada

S<sub>1</sub> = Suero original  
S<sub>2</sub> = Suero modificado

### III.—RESULTADOS

### *Adaptación del virus a cultivo de tejidos.*

Después de numerosos intentos para lograr el desarrollo del virus en cultivo de tejidos, de los que hablaré primeramente, se logró hacer que éste creciera siguiendo el Esquema 1.

#### *Tejidos de nuevo embrionado.*

Membrana Corioalantoidea.  
Embrión total.

Primeramente se procedió a obtener el cultivo de tejidos a partir de membrana corioalantoidea y de células del embrión total. Las células de la membrana corioalantoidea presentan cierta dificultad para adherirse a la pared de la botella por lo que el desarrollo no era suficiente. Sin embargo, se siguió usando este cultivo paralelo al de las células de embrión para comparar los resultados; debido a que estos fueron poco concluyentes se desechó el cultivo de células de membrana corioalantoidea.

### *Virus*

Virus liofilizado.  
Virus recién aislado.

Se inocularon los virus liofilizados y el de la cepa recién aislada simultáneamente tanto en el cultivo de células de embrión como en el cultivo de células de membrana.

Esto se llevó a cabo con virus concentrado y diluido 1:10; observándose mejor desarrollo del virus de la cepa sin liofilizar por lo que se empleó ésta para la inoculación de las botellas.

### *Médios de cultivo.*

Medio de Melnick.

Medio 199.

El medio de Melnick se usó para el desarrollo de las células obteniéndose muy buenos resultados.

El medio 199 se utilizó para el desarrollo del virus, encontrándose escaso desarrollo, por lo que se probó el medio de Melnick. Este dió también en este caso, resultados satisfactorios.

#### Esquema 1

Se siguió el plan de hacer los pases por cultivo de tejidos alternados con un pase por huevos embrionados para estimular el desarrollo del virus constituyendo esto la cadena vertical.

Simultáneamente se hicieron los pases del virus solamente en botellas con cultivos de tejidos, lo que representa la cadena horizontal.

Para la obtención del desarrollo del virus en cultivo de células de embrión de pollo en el Esquema 1 hubo necesidad de efectuar 10 nuevas siembras celulares a partir de embriones de pollo de 11 días siguiendo el método citado en el capítulo segundo.

Los mejores resultados se obtuvieron sembrando  $55 \times 10^4$  células por ml. de medio de Melnick, que fueron incubadas durante 5 días a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Una vez obtenido el desarrollo de las células se procedió a la inoculación del virus (por duplicado siempre) utilizándose la cepa Buckenau con  $\text{ID}_{50}$  en membrana corioalantoidea igual a 0.2 ml. de dilución  $1:10^{-1}$  y como medio de cultivo el medio 199, éste posteriormente se cambió por el medio de Melnick que dió mejores resultados. Cuando no hay cambio en el color del medio indica crecimiento del virus.

Constituye lo anterior el primer pase y punto de partida de la

cadena vertical, y por consecuencia punto de partida para la primera cadena horizontal.

De cada pase se extrajo el cubre-objetos, que previamente se colocó en el interior de las botellas con el objeto de observar al microscopio las lesiones citopatológicas ocasionadas por el virus a las células.

Hay diferentes afinidades de los virus por las células, causando algunos lesiones en el protoplasma que se manifiestan por la aparición de vacuolas; otros causan lesiones en el núcleo deformándolo hasta llegar a dispersarlo.

El virus de la viruela Aviar ataca al núcleo deformándolo hasta presentar formas alargadas y algunas veces disgregándolo.

A cada pase por botella se le hizo la prueba de supervivencia en 6 huevos comprobando así los efectos citopatogénicos de las células.

Una vez resultando positivas estas dos pruebas se efectúa el siguiente pase a botella.

#### *Cadena Vertical.*

##### *Primer Pase por Botella.*

Se inoculó 1 ml. del virus de la cepa original a la botella I y se incubó durante 4 días a 37°C.

##### *Primer Pase por Huevo.*

Se inocularon 6 huevos con 0.2 ml. del líquido del primer pase por botella, siendo incubados a 37°C. por espacio de seis días. Resultando 4+ de desarrollo.

##### *Segundo Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el pri-

mer pase y se procede a la inoculación de las botellas II con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar durante 4 días a 37°C.

#### *Segundo Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 2o. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4+ de desarrollo.

#### *Tercer Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 2o. pase y se procede a la inoculación de las botellas III con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar durante 4 días a 37°C.

#### *Tercer Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 3er. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4+ de desarrollo.

#### *Cuarto Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 3er. pase y se procede a la inoculación de las botellas IV con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar 4 días a 37°C.

#### *Cuarto Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 4o. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4+ de desarrollo.

#### *Quinto Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 4o. pase y se procede a la inoculación de las botellas V con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar 4 días a 37°C.

#### *Quinto Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 5o. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4 : de desarrollo.

#### *Sexto Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 5o. pase y se procede a la inoculación de las botellas VI con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar 4 días a 37°C.

#### *Sexto Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 6o. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4 : de desarrollo.

#### *Séptimo Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 6o. pase y se procede a la inoculación de las botellas VII con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar 4 días a 37°C.

#### *Séptimo Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 7o. pase por botella se inocularon huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4 : de desarrollo.

#### *Octavo Pase por Botella.*

Se cosecharon las membranas de los huevos infectados en el 7o. pase y se procede a la inoculación de las botellas VIII con 1 ml. de suspensión, dejándose incubar 4 días a 37°C.

#### *Octavo Pase por Huevo.*

Con 0.2 ml. de suspensión del 8o. pase por botella se inocula-

ron huevos, incubándolos por un lapso de 6 días a 37°C. Resultando 4+ de desarrollo.

#### *Primera Cadena Horizontal.*

La botella I en que se efectuó el primer pase sirvió de punto de partida para la primera cadena horizontal, suprimiéndose los pases por huevo para lograr la adaptación del virus al desarrollo exclusivamente en cultivo de tejidos. Explicado ya anteriormente el primer pase, de la suspensión obtenida en éste se inoculó 1 ml. a la botella 2 dejándose incubar durante 4 días a 37°C, constituyendo el segundo pase y así sucesivamente hasta el 3er. pase en que el desarrollo del virus fue negativo.

#### *Segunda Cadena Horizontal.*

De la botella II de la cadena vertical se llevó a cabo la segunda cadena horizontal, en la forma siguiente: de la suspensión de la botella citada se inoculó 1 ml. a otra botella con células, y así sucesivamente, hasta llegar al 5o. Pase en el que el crecimiento del virus fue negativo.

- 1a. Botella : : : de desarrollo.
- 2a. Botella : : : de desarrollo.
- 3a. Botella : : : de desarrollo.
- 4a. Botella : : : de desarrollo.
- 5a. Botella : : : de desarrollo.

Por lo que se suspendió esta cadena.

#### *Tercera Cadena Horizontal.*

De la Botella III de la Cadena vertical se llevó a cabo la tercera cadena horizontal, siguiendo al misma técnica que para las otras cadenas.

- 1a. Botella + + + + de desarrollo.
- 2a. Botella + + + + de desarrollo.
- 3a. Botella + + + de desarrollo.
- 4a. Botella + + de desarrollo.
- 5a. Botella + de desarrollo.
- 6a. Botella - de desarrollo.

*Cadena 3a. Horizontal.*

Esta cadena resultó al observar el poco éxito en el desarrollo de virus pues se pensó en dar un estímulo por huevo después de la botella 2 de la cadena III. (En la que hubo + + + + de desarrollo).

- 1a. Botella + + + + de desarrollo.
- 2a. Botella + + + + de desarrollo.
- 3a. a 15a. Botella + + + + de desarrollo.

*Cuarta Cadena Horizontal.*

- 1a. Botella + + + + de desarrollo.
- 2a. a 4a. Botella + + + + de desarrollo.
- 5a. a 15a. Botella + + + + de desarrollo.

*Quinta Cadena Horizontal.*

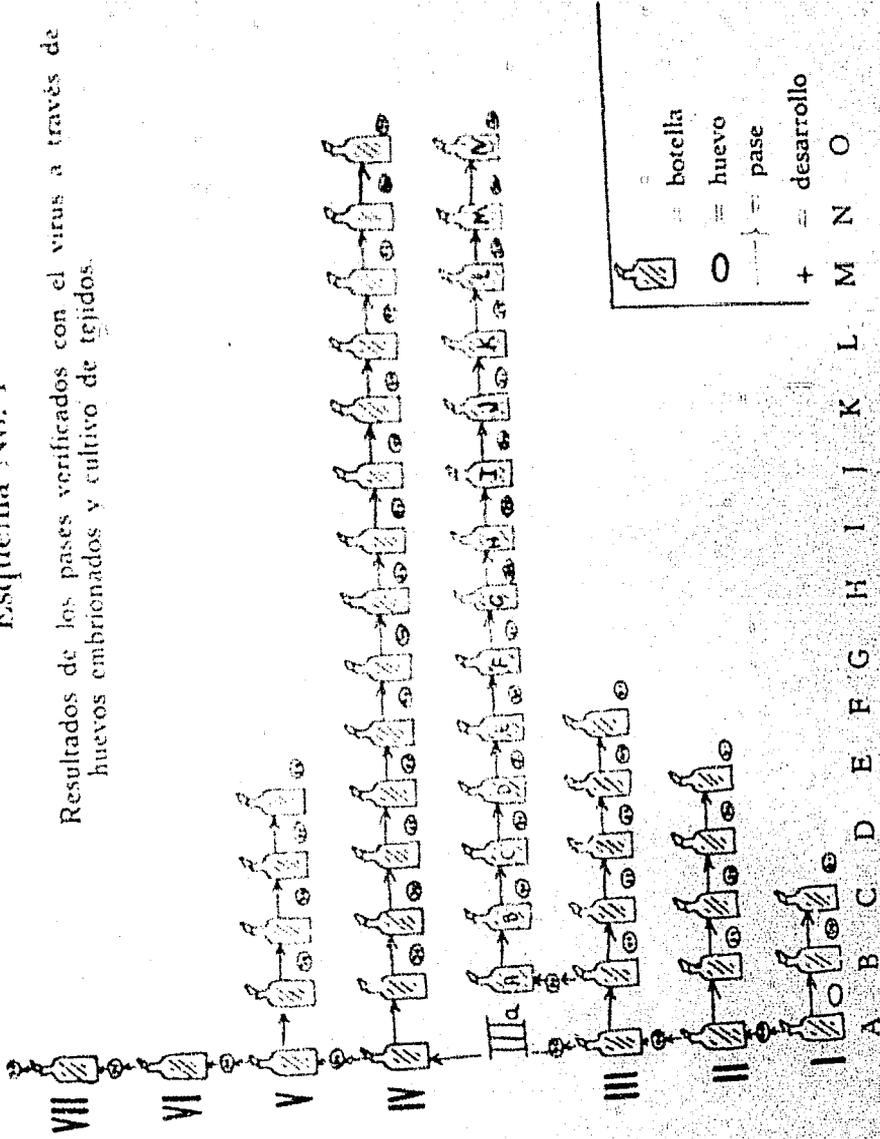
- 1a. Botella + + + + de desarrollo.
- 2a. a 3a. Botella + + + + de desarrollo.
- 4a. a 5a. Botella + + + + de desarrollo.

Esta cadena se siguió hasta el 5o. pase pues se hacía simultáneo a las otras como precaución, es decir, para no empezar la cadena siguiente desde el principio cuando no se hubieran obtenido resultados en las cadenas anteriores.

Se suspendió esta 5a. cadena pues ya se había adaptado el virus a desarrollar en cultivo de células de embrión total.

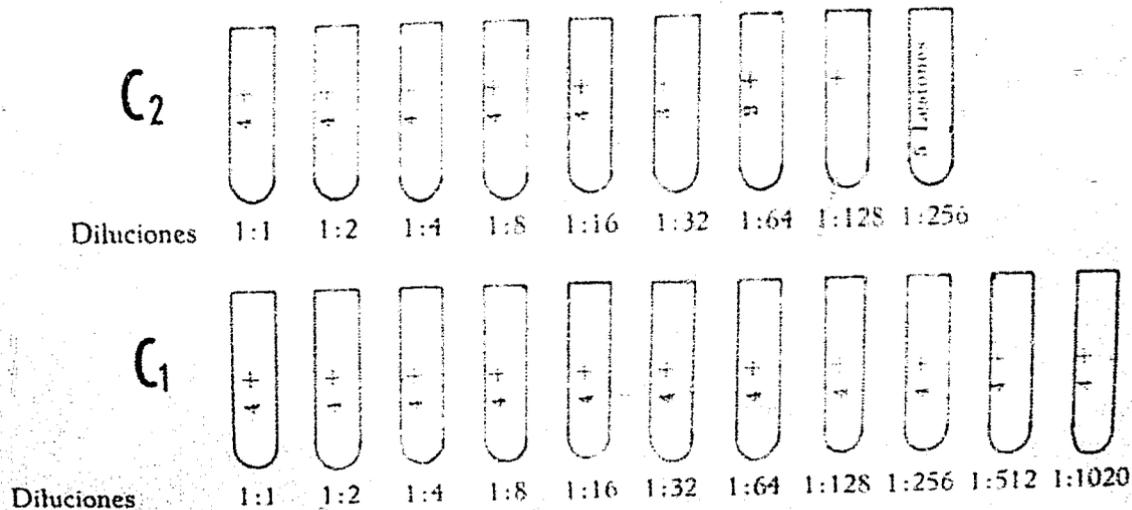
# Esquema No. 1

Resultados de los pases verificados con el virus a través de  
huevos embrionados y cultivo de tejidos.



## Esquema No. 2

Resultados obtenidos en la determinación de la dosis infectante en embrión de pollo



C<sub>2</sub> — Virus obtenido el 10° pase por botella de la IV Cadena horizontal.

C<sub>1</sub> — Virus original

4	+	Intensidad de desarrollo
3	+	
2	+	
	+	
	+	

## Observaciones del Esquema número 2.

Cepa al 10º Pase por botella

A partir de la dilución de 1:32 se obtuvo una disminución en el desarrollo de los virus hasta la dilución de 1:256 donde se obtuvieron 5 lesiones; teniendo en cuenta que una dosis infectante equivale a una lesión tenemos que

$$256 \times 5 = 1280$$

entonces habrá 1280 dosis infectantes en 0.2 ml. de suspensión de virus de la 10a. botella

Cepa Original.

Se utilizaron diluciones hasta 1:1020 observándose en todas las diluciones un desarrollo exuberante, este experimento con la cepa original se hizo como punto de comparación para ver si no había bajado su poder infectante durante el tiempo en que se verificó el trabajo.

Resultados en la determinación del grado de virulencia en aves de la cepa obtenida al 6o. Pase.

La inoculación por escarificación de la cresta en tres pollos para cada cepa; se observó durante 6 días al cabo de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Las aves inoculadas con la cepa original presentaron numerosas lesiones localizadas en la cresta y órbitas.

Las aves inoculadas con la cepa obtenida al 6o. Pase por Botella presentaron lesiones, aproximadamente el 10% con respecto a la cepa original.

### Esquema No. 3.

Resultados de la potencia del suero de aves vacunadas tanto con la cepa original como con la cepa obtenida al 6o. Pase en cultivo.

Esquema No. 3

"A"			"B"		
		$C_1 + S_1$			$C_2 + S_1$
$A_1$	1:1	4 +	$B_1$	1:1	+
$A_2$	1:5	4 +	$B_2$	1:5	2 +
$A_3$	1:10	5 +	$B_3$	1:10	2 +
$A_4$	1:100	6 +	$B_4$	1:100	3 +

"C"			"D"		
		$C_1 + S_2$			$C_2 + S_2$
$C_1$	1:1	3 +	$D_1$	1:1	—
$C_2$	1:5	3 +	$D_2$	1:5	—
$C_3$	1:10	Muertos	$D_3$	1:10	—
$C_4$	1:100	4 +	$D_4$	1:100	+

El suero obtenido de las ave vacunadas con las dos cepas se usó en las diluciones indicadas en el esquema (No. 3).

Y las cepas se usaron sin diluir en todos los casos.

Caso A.—Como puede observarse el suero de la cepa original al ponerse frente a la misma cepa hubo una muy escasa neutralización.

Caso B.—El suero de la cepa original neutraliza pero no en alto grado a la cepa modificada.

Caso C.—El suero de la cepa modificada neutraliza la cepa original pero también no en alto grado.

Caso D.—El suero de la cepa modificada neutraliza fuertemente su cepa homóloga.

Esquema No. 4

Experimento 2.

Resultados de la potencia del suero de aves vacunadas tanto con la cepa original como con la cepa obtenida al 60. pase en cultivo de tejidos.

"A" C <sub>1</sub> + S <sub>1</sub>				"B" C <sub>2</sub> + S <sub>1</sub>			
Diluciones de la cepa del suero	AD	1:1000	2 +	Diluciones de la cepa del suero	BC	1:100	3 +
	AC	1:100	3 +		BB	1:10	4 +
	AB	1:10	5 +		BA	1:5	4 +
	AA	1:5	4 +		B <sub>1</sub>	Sin diluir	5 +
	A <sub>1</sub>	Sin diluir	6 +		B <sub>2</sub>	1:5	4 +
	A <sub>2</sub>	1:5	6 +		B <sub>3</sub>	1:10	4 +
	A <sub>3</sub>	1:10	5 +		B <sub>4</sub>	1:100	4 +
	A <sub>4</sub>	1:100	5 +				
"C" C <sub>1</sub> + S <sub>2</sub>				"D" C <sub>2</sub> + S <sub>2</sub>			
Diluciones de la cepa del suero	CC	1:100	±	Diluciones del suero	D <sub>1</sub>	Sin diluir	-
	CB	1:10	1 +		D <sub>2</sub>	1:5	-
	CA	1:5	1 +		D <sub>3</sub>	1:10	-
	C <sub>1</sub>	Sin diluir	2 +		D <sub>4</sub>	1:100	-
	C <sub>2</sub>	1:5	3 +		D <sub>5</sub>	1:1000	±
	C <sub>3</sub>	1:10	4 +		D <sub>6</sub>	1:10000	2 +

Caso "A".—Como en el primer experimento, el suero de la cepa original también dió muy escasa neutralización frente a la cepa homóloga, diluyendo el virus si hubo una neutralización ascendente cuando había una dilución cada vez mayor de los virus.

Caso "B".—El suero de la cepa original, también en este experimento, neutraliza a la cepa modificada en un grado muy bajo ya que aún en dilución 1:100 es poco notoria.

Caso "C".—El suero de la cepa modificada neutraliza la cepa original no en alto grado y diluyendo el virus 1:5; frente a suero concentrado hubo una marcada neutralización.

Caso "D".—El suero de la cepa modificada en este experimento, neutraliza a su cepa homóloga casi totalmente, hasta la dilución 1:10000.

#### IV.—CONCLUSIONES

1.—En el desarrollo de células de tejido en botellas, los mejores resultados fueron obtenidos con células de embrión total, pues las células procedentes de membrana corioalantoidea presentaron dificultad de adherirse a la pared de la botella por lo que no se desarrollan suficientemente los virus.

2.—La viabilidad de las células de embrión total continuó por periodos hasta de veinte días.

3.—Al usarse tanto el virus liofilizado como el recién aislado pudo comprobarse que los últimos desarrollaron más fácilmente en cultivo de tejido que los liofilizados probablemente porque afecte al virus la liofilización o el tiempo de almacenaje.

4.—El virus de la viruela aviar pierde la propiedad de reproducirse con las congelaciones y descongelaciones.

5.—El medio de Melnick presentó excelentes resultados tanto para el desarrollo de células como para el crecimiento del virus en relación con el medio 199.

6.—De los resultados del Esquema 1 podemos concluir que el virus logró adaptarse al cultivo de tejidos porque:

a) El pase por huevo en la cadena vertical estimula periódicamente el desarrollo del virus.

b) En la 1a., 2a. y 3a. cadenas puede verse una progresiva adaptación del virus a cultivo de tejido.

c) En la cadena III A, puede verse que el pase por huevo antes de empezar ésta, incrementó grandemente el crecimiento anterior.

obteniéndose sólo una ligera disminución de éste respecto al desarrollo normal del virus.

d) En la cadena IV ya puede verse una adaptación hasta el 15o. pase por botella.

7.—Respecto a la infectividad en embrión de pollo hay una disminución respecto a la cepa original causada tal vez por:

a) Disminución del número de virus en la botella en comparación a la cepa original desarrollada en membrana corioalantoidea donde presenta su desarrollo máximo.

b) Disminución de la infectividad causada por el cambio de medio de vida, de membrana corioalantoidea por cultivo de tejidos.

8.—La virulencia de la cepa del 6o. pase en la cresta de pollo, disminuyó en gran escala respecto a la cepa original pudiendo ser:

a) Debido a que los virus eran menos numerosos en los cultivos de las botellas, que en la cepa original que procedía de la membrana corioalantoidea en donde es sabido se desarrollan exuberantemente.

b) Debido a una disminución tanto de la extensión como de la disminución en la intensidad de reacción del virus al 10o. pase causadas en la adaptación al nuevo medio de vida.

9.—*Potencia del Suero.*—Este experimento no se hizo en una escala suficientemente grande como para obtener datos exactos pero puede observarse los probables resultados.

a) *Caso A.*—En el que hubo una muy escasa neutralización del suero frente a su cepa homóloga puede deberse:

1o.—A que la cepa no había sido pasada recientemente por huevo y tal vez la duración del almacenaje tuvo efectos perjudiciales sobre el poder inmunizante de la cepa.

2o.—Debido a que el virus estaba muy concentrado y el suero no alcanzó a neutralizar el virus.

b) *Caso B.* — El suero de la cepa original neutraliza pero no en grado bajo a la cepa obtenida del 6o. pase en cultivo de tejidos pudiendo ser debido a que:

1o.—El suero de la cepa original como ya se dijo puede tener un título muy bajo por haber bajado el poder inmunizante de la cepa original al almacenarse el tiempo que duró este trabajo.

2o.—A que la adaptación del virus a otro medio de vida produzca una cepa un tanto modificada.

c) *Caso C.*—El suero de la cepa de cultivo de tejidos neutraliza la cepa original en un nivel más bajo que el suero original frente a la cepa de cultivo de tejidos ocasionado esto probablemente:

1.—Debido a la elevada concentración de la cepa original.

2.—Teniendo en cuenta además que seguramente la cepa de cultivo de tejidos usada para la inmunización tenía una concentración mucho menor a la empleada por la cepa original ya que como se ha repetido, la cepa original fue obtenida de la membrana corioalantoidea donde presenta excelente desarrollo.

d) *Caso D.*—El suero de la cepa modificada produce un suero con un poder neutralizante bastante elevado.

e).—El suero de la cepa modificada tuvo en este trabajo más poder de neutralización para la cepa original que el suero original, o sea, que tiene más poder antigénico el suero de la cepa modificada.

f).—El suero modificado neutraliza más fuertemente su propia cepa que a la cepa original.

De los resultados obtenidos en el primer experimento, para probar el poder neutralizante de los sueros de las dos cepas en estudio,

se pensó que el resultado negativo de la cepa original frente a su suero homólogo, podría ser debido en parte a la alta concentración de la cepa. Para comprobar esta suposición, se hizo un segundo experimento, usando los sueros sin diluir frente a las dos cepas en diluciones progresivas.

g) Caso "A".—En los resultados de estas pruebas, se notó una neutralización positiva cuando se diluye el virus.

h) Caso "B".—De los resultados en el segundo experimento respecto al primero puede verse que el suero de la cepa original en este segundo experimento resultó más débil que en el primer experimento. Probablemente debido a una diferente respuesta de los pollos; pero pudo verse que a la dilución 1:100 del virus hay una ligera neutralización.

i) Caso "C".—Los resultados en este segundo experimento y en el primero, respecto a los pasos que se repitieron, fueron un poco divergentes; sólo que ya se nota en la dilución del virus 1:5 una marcada neutralización.

j) Caso "D".—Los resultados también en este caso, confirman el primer experimento, y además se observó que el suero a dilución 1:100 tenía un poder neutralizante elevado.

De los resultados bajos observados en el primer experimento, puede decirse que la cepa original usada, se encuentra a elevada concentración.

k).—El suero de la cepa original, sólo a dilución de 1:100 del virus modificado empieza a neutralizar esta cepa.

l).—Se comprobó que el suero de los pollos inoculados con virus proveniente de cultivo de tejido tiene un poder neutralizante mayor que el suero de pollos inoculados con virus cultivado en membrana coricalantoidea de huevos embrionados.

10.—Las Ventajas de este método para una futura producción de vacunas son las siguientes:

1).—Es mucho más sencillo emplear el cultivo de tejidos que huevos embrionados por el delicado cuidado de observación y manejo de éstos.

2.—Se elimina grandemente la contaminación proveniente de los huevos.

3.—Prácticamente puede verse que económicamente es mejor.

4.—Respecto al virus se puede decir también por la numerosas observaciones, que este método daría una uniformidad en el crecimiento de los virus ya que se podrían hacer lotes grandes de botellas con cultivos de tejidos sometidos a las mismas condiciones de desarrollo, por lo tanto estos cultivos producirían un medio uniforme para el virus cosa que no se obtiene en huevos embrionados por su diferente procedencia y porque cada uno en su modo de reaccionar es individualmente distinto.

5.—Sin embargo, no hay que olvidar que la eficacia de los distintos tipos de vacunas depende de la cantidad de proteínas de virus que contenga y que las buenas vacunas se deben hacer a partir, solamente, de cultivos ricos en virus de alta virulencia y antigenicidad. Y debe tenerse en cuenta que si los virus se cultivan en células diferentes a las del huésped natural, existe la posibilidad de producir cepas modificadas las cuales pueden perder su virulencia y antigenicidad; pero conservan su poder de reproducirse.

En este trabajo puede verse que en la cepa que logró adaptarse al desarrollo en cultivos de tejido la virulencia disminuye, favoreciendo ésto la vacuna, con ella producida, porque no dió reacción tan fuerte al ser aplicada a los pollos. En cambio tenemos que tanto su capacidad de reproducirse como su poder antigénico es bastante aceptable.

## V.—RESUMEN

1.—Se trató de adaptar dos cepas del virus de la viruela aviar, a dos concentraciones, al cultivo de tejidos, usando membrana corioalantoidea y embrión total.

2.—Se logró adaptar la cepa recién aislada de virus de la viruela aviar a cultivo de tejidos de embrión de pollo hasta el quinceavo pase.

3.—Se comprobó la existencia del virus, en cada paso necesario, para lograr su adaptación en cultivo de tejidos. La comprobación se hizo por la observación de los cambios citopatológicos en las células cultivadas e inoculadas con el virus y por las lesiones en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados al ser inoculados con los líquidos de los cultivos en tejidos.

4.—Se determinó la dosis infectante en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados, tanto de la cepa modificada como de la cepa original, para comparar los resultados.

5.—Se estudió la virulencia paralelamente en aves, de la cepa modificada y de la cepa original.

6.—Se hizo reaccionar las cepas, tanto modificada como original, con los sueros producidos por ellas en pollos.

Las reacciones fueron con su suero homólogo y reacciones cruzadas, para estudiar comparativamente su poder antigénico.

## VI.—BIBLIOGRAFIA

1. — Adaptación para virus y Rickettsias.  
Enfermedades de laboratorio.  
Estado de California Departamento de Salubridad Pública.  
Unit. 5/20/57.
2. — *Beaudette, F. R.* 1949.  
Twenty years of progress in immunization against virus  
diseases of birds.  
Jour. Am. Vet. Med. Assn. 115: 232.
3. — *Biester, H. E., and Schwarte, L. H.* 1952.  
Diseases of Poultry.  
3a. Ed. Ames, Iowa: The Iowa State College Press.
4. — *Carnwarth, T.* 1908.  
Zur Aetologie der Hühnerdiphtherie and Geflügelpocken.  
Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. 27: 388.
5. — *D'Herelle, F.* 1917.  
C.R. Acad. Sci. 165: 373.
6. — *Goodpasture, E. W.* 1928.  
Virus diseases of fowls as exemplified by contagious epithelioma  
(Fowl pox) of chickens and pigeous.  
In Filterable Viruses.  
T. T. Rivers, Williams and Wilkins Co., Baltimore. 235.
7. — *Hagan Williams Arthur, D.V.M., D. SC., y Dorsey  
William Bruner, D.V.M., Ph. D.* 1952.  
Las enfermedades infecciosas de los animales domésticos.  
2da. Ed. de la Prensa Médica Mexicana. D.F. 560-570.
8. — *Holmes, F. O.* 1948.  
Order Virales, Supplement No. 2.  
In. Bergey's Manual of determinative Bacteriology.  
The Williams and Wilkis Co., Baltimore.

9. —Hurtado, P.  
Copilación de notas sobre medios de cultivo para virus.
10. —Kelser, A. Raymond, D.V.M., A.M., Ph. D. y Schoening,  
W. Harry, V.M.D. 1946.  
Manual de Bacteriología Veterinaria.  
4a. Ed. 493, 495 y 496.
11. —Kligler, Mackenquiss and Rivers. 1929.  
Jour. Exp. Med. 49, 649.
12. —Kolme., J. A. and Boerner, F. 1948.  
Métodos de laboratorio clínico.  
2da. Ed. Editora Interamericana; S. A. México, D.F.
13. —Marx, E. und Sticker, A. 1902.  
Untersuchungen über das Epithelioma Contagiosum des  
Geflügels.  
Deutsch. Med. Wochenschr. 28: 893.  
Cited by Goodpasture. 1928.
14. —Matheson, Brunett and Brody. 1930.  
Poultry Science. 10. 211.
15. —Merchant Ival Arthur, D.V.M., Ph. D., C.P.H. 1953.  
Veterinary Bacteriology and Virology.  
4a. Ed. The Iowa State College Press Ames, Iowa.
16. —Paul John, M. B., Ch. B., Ph. D., M.R.C. P. 1959.  
Cell and Tissue Culture  
E. & S. Livingstone LTD. Edimbug and London.  
56, 59, 60, 95, 96, 97, 173, 244.
17. —Salk, Younger and Ward. 1954.
18. —Stanley, W. M. 1935.  
Science. 81, 664.

19. — *Twort, F. W.* 1915.  
Lancet 2: 1241.
20. — *Vilches and Hiest.* 1947.  
Jour. Immunol. 57, 125.
21. — *Woodruff, C. E. and Goodpasture, E. W.* 1929.  
The infectivity of isolated inclusion bodies of fowl-pox.  
Am. Jour. Path. 5: 1.
22. — *Woodruff and Goodpasture, E. W.* 1930.  
The relation of the virus of fowl-pox to the specific cellular  
inclusions of the disease.  
Am. Jour. Path. 6: 713.
23. — *Woodruff, A. M. and Goodpasture, E. W.* 1931.  
The Susceptibility of the Chorio-allantoic membrane of chick  
embryo to infection with the fowl-pox virus.  
Am. Jour. Path. 7: 209.