
FACULTAD DE QUIMICA

UNAM

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL
VIRUS DE VACCINIA EN VARIOS
GRUPOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ALMA GUADALUPE FAISAL JUAREZ

MEXICO, D. F.

1977





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.

CLAS Tesis 1977
ABQ M-142
FECHA _____
PREC _____



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	OSCAR AMOR DODERO
VOCAL:	MAGDALENA ACOSTA SÉGURA
SECRETARIO:	SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE:	ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA
2a. SUPLENTE:	SOCORRO CAO ROMERO MARTINEZ

Sitio donde se desarrollo el tema
Laboratorio de Virología del Hospital del Niño
I.M.A.N.

Sustentante

ALMA GUADALUPE FAISAL JUAREZ

Asesor del tema

DR. SALVADOR MARTIN SOSA

A LA MEMORIA DE MI QUERIDA MAMACITA MARGARITA
COMO UNA MUESTRA DE GRATITUD POR TODOS LOS
SACRIFICIOS QUE HIZO PARA QUE YO SIGUIERA ADE_
LANTE, GRACIAS TE DOY

A LA SAGRADA MEMORIA DE MI INOLVIDABLE PADRE
GUILLERMO DE QUIEN SIMPRE TUVE CONSEJOS CA--
RIÑO, COMPRESION Y TERNURA, QUE DESDE DONDE
ESTES VEAS REALIZADO TU ANHELO .

A MI QUERIDA MADRECITA MA. ANTONIA
CON PROFUNDO CARIÑO Y AGRADECIAMIENTO POR TODO
LO QUE HA HECHO POR MI.

A MIS QUERIDOS HERMANOS

RAUL, MEMO, QUICO,
TERE, ROME Y VICTOR
MANUEL. POR TODO EL CARIÑO QUE CADA UNO ME HA
DADO.

CON TODO MI AMOR A PACO
POR EL CARIÑO, LA AYUDA Y EL APOYO QUE EN TODO MO-
MENTO ME HA BRINDADO.

COMO UNA MUESTRA DE AGRADECIMIENTO Y CARIÑO

A MIS TIOS

TRINY

RAUL

Y

LUPE

POR LA AYUDA DESINTERESADA QUE ME BRINDARON

A MI ABUELITO MIGUEL
COMO UNA MUESTRA DE CARIÑO Y GRATITUD.

AL DR. SALVADOR MARTIN SOSA
CON ADMIRACION Y AGRADECIMIENTO POR LA AYUDA Y EL
INTERES DEMOSTRADO EN LA COORDINACION DE ESTE - -
TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO
DE QUIENES HE RECIBIDO COSAS TAN PRECIADAS COMO
SON CARIÑO Y AMISTAD.

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
I GENERALIDADES	
A) HISTORIA	3
B) CARACTERISTICAS DEL VIRUS	
1). Clasificación	6
2). Morfología	8
3). Composición Bioquímica	11
4). Efecto de los agentes físicos y químicos	13
5). Replicación en sistemas celulares	14
6). Características antigénicas	17
C) DIFERENTES FORMAS CLINICAS DE LA INFECCION	
1) Infección "in utero y congenitas	19
2) Infección adquirida o posnatal	20
D) TRANSMISION Y PATOGENIA	22
E) RESPUESTA INMUNOLOGICA	27
F) EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL	28
G) VACUNACION ATIVARIOLOSA	31
H) TRATAMIENTO DE LA VIRUELA	33
I) DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	35
J) GENERALIDADES SOBRE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION.	39

		PAG
	K) OTRAS PRUEBAS DE NEUTRALIZACION	40
II	MATERIAL Y METODOS	
	A) CEPA VIRAL	44
	B) PREPARACION DEL ANTIGENO VIRAL	45
	C) PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR	47
	D) CONTEO DE CELULAS	49
	E) TITULACION DEL VIRUS	50
	F) CALCULOS PARA DETERMINAR EL TITULO DEL VIRUS	54
	G) PRUEBA DE NEUTRALIZACION	58
III	RESULTADOS Y DISCUSION	64
IV	CONCLUSIONES	73
V	BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUCCION

El problema mundial de la viruela como enfermedad endémica ha cambiado favorablemente y en forma notable durante los últimos años, debido principalmente a programas de erradicación de nivel nacional e internacional y también en grado muy importante gracias al mejoramiento de la calidad de las vacunas utilizadas; sin embargo, algunos expertos siguen considerando que la vacunación antivariolosa no deberá abandonarse por algún tiempo, inclusive en países donde la enfermedad fue erradicada hace muchos años, como es el caso de México.

Si bien las posibilidades de erradicación mundial de la viruela parecen aumentar día a día, es imposible prever cuanto tiempo será necesario para lograrla. Mientras tanto parece evidente la necesidad de mantener un nivel inmunitario elevado para reducir el riesgo de casos de viruela derivados de la importación del virus a comunidades libres de éste; tales riesgos son, además, mucho más numerosos en países con una infraestructura sanitaria deficiente.

En los países desarrollados la atención se ha centrado en la morbilidad que se produce a consecuencias de la vacunación misma, y de hecho son las complicaciones, que ocurren raras veces, las que

han inducido a muchos especialistas a proponer que se descontinúe la vacunación rutinaria que nos ha conducido a la situación actual, libre de viruela.

La importancia de la calidad de la vacuna está bien documentada y puede afirmarse que gran parte del éxito alcanzado en el control de ésta enfermedad se debe a que en los últimos años ha sido posible producir vacunas de elevada potencia y estabilidad.

También se reconoce la importancia de precisar periódicamente el estado inmunitario de la población a fin de complementar la información epidemiológica y de utilizar los recursos de inmunización de la manera más racional.

La finalidad del presente trabajo es determinar la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de vaccinia en un grupo representativo de población abierta en la Ciudad de México, y tratar de evaluar los riesgos a que está expuesta la comunidad analizada, en función de los hallazgos serológicos y de la situación epidemiológica nacional e internacional de ésta enfermedad.

CAPITULO I

GENERALIDADES

HISTORIA

La viruela fué uno de los más grandes azotes que padeció - la humanidad hasta que Edward Jenner en 1798 introdujo la vacuna-- ción.

La viruela fué descrita por primera vez por Galeno en el si glo II y después por Rhazes en el siglo X (1). Ha sido clasificada como una enfermedad de peligro ya que presenta un cuadro clínico - severo, sin embargo la viruela no se ha desarrollado después de al- gunos años, aunque hay formas endémicas en el sureste de Asia, A- frica, Europa occidental y América (2).

La viruela fué traída al Nuevo Mundo e introducida a tierras mexicanas por la expedición punitiva encabezada por Pánfilo de Nar- váez contra Cortés en 1521, época en la que se menciona la primera gran epidemia ocurrida en Zempoala Ver., la cual causó numerosas defunciones y dejó muchos ciegos y "cacarizos". Desde entonces y hasta la aplicación de programas de erradicación, México pagó un - enorme tributo al padecimiento (3).

La viruela es una enfermedad esencialmente del hombre y -

no se conoce reservorio animal. Puede ocurrir en dos formas distintas clínicas y epidemiológicamente: la forma clásica, severa o viruela mayor, con una mortalidad de 15-30% aproximadamente, y la segunda forma llamada viruela menor o alastrim con una mortalidad menor del 1%. La viruela mayor es endémica en el sureste de Asia y Africa, mientras que la viruela menor es predominante en Brasil, pero ha ocurrido también en Africa e Indonesia (4).

El último caso de viruela notificado oficialmente en la República Mexicana se registro en 1951, en la que habitualmente fué la región más afectada, ésto es, la parte central del país. De 1952 a la fecha las autoridades sanitarias mexicanas han mantenido al país libre de viruela, basándose principalmente en la vacunación y en el control de viajeros e inmigrantes (3).

Muy recientemente la Organización Mundial de la Salud ha informado que solo Etiopía sigue presentando viruela en forma endémica, y que desde el 16 de Octubre de 1975 no han sido detectados casos en Asia. Estas noticias tan alentadoras, sin embargo, deben ser tomadas con un mínimo de reservas y no es conveniente adoptar una actitud demasiado optimista sobre la erradicación total de la viruela. Si es muy probable que esta meta se alcanzará pronto, pero mientras tanto será aconsejable mantener la vigilancia epidemiológica y un buen nivel de inmunidad en la población general (5).

En nuestro país, el último estudio seroepidemiológico sobre viruela fué reportado en 1968 por Calderón y Col. (6), quienes observaron una escasa protección inmunológica (alrededor del 25% solamente) en los grupos de la Ciudad de México estudiados.

Es de creerse que el abandono o la disminución de las recomendaciones tendientes a mantener niveles razonables de inmunidad en nuestro medio, se explica al menos en parte por la erradicación de la enfermedad desde hace 25 años, hecho que ha conducido a confiar un tanto ciegamente en que el problema no volverá a presentarse en México. Si bien es muy probable que así sea, nos parece preferible no descuidar tan abiertamente el estado inmunitario de la población e insistir en la vacunación periódica por algunos años más, pues cuesta poco y, en cambio, el costo social y en vidas sería seguramente bastante elevado si el virus de viruela circulara de nuevo en nuestro país.

CARACTERISTICAS DEL VIRUS

CLASIFICACION

El grupo de los poxvirus por su manera de ser se acordó - clasificarlos dentro de la familia "POXVIRIDAE" por el Comité Provisional de Nomenclatura de los Virus, la cual comprende seis géneros sobre la base de su parentesco antigénico.

Este es un grupo característico por su ADN. En el primer grupo están incluidos viruela, alastrim y vaccinia, los cuales - son los que revisten más importancia para la medicina humana (7).

CUADRO N° 1

FAMILIA	GENERO	E S P E C I E	HOMBRE	ANIMALES
Poxviridae	Poxvirus	Viruela	+	
		Alastrim	+	
		Vaccinia	+	Terneras y Borregos
		Viruela de los conejos	-	Conejos
		Viruela de los monos	-	Monos
		Ectromelia	-	Ratones
		Viruela de las vacas	+	Ganado
	Dermovirus	Dermatitis pustular contagiosa	+	Borregos
		Dermatitis papular bovina	-	Ganado
	Pustulovirus	Viruela de los borregos	-	Borregos
Viruela de las cabras		-	Cabras	
Hinchazón de la piel		-	Ganado	
Viruela de los cerdos		-	Cerdos	
Viruela de los caballos		+	Caballos	
	Viruela de los camellos	+	Camelios	
Avipoxvirus	Viruela de los pollos	-	Pollos	
	Viruela de los canarios y otros pájaros.	-	Algunas especies	
Fibromavirus	Mixoma del conejo	-	Conejos	
	Fibroma del conejo	-	Conejos	
	Fibroma de las ardillas	-	Ardillas	
Moluscovirus	Molusco contagioso	+		
Género no asignado.	Nódulos de los lecheros	+	Ganado	
	Virus de los monos Yaba	-	Monos	

MORFOLOGIA

Los virus de la viruela fueron vistos al microscopio por primera vez en linfa variolosa por Buist en 1887, gracias a que son de los más grandes (8).

Son de los virus que más tempranamente fueron sujetos a estudios morfológicos detallados. Tienen un peso molecular de 160 millones de daltons, son relativamente grandes y aparecen ovalados cuando se examinan en secciones de tejido de células infectadas, pero se observan en forma de ladrillo cuando están secos y se ven al microscopio electrónico (7).

Primero se dedujo el tamaño del virus por estudios de centrifugación y filtración, siendo aproximadamente de $250-300 \times 150-200 \times 100$ nm. Después por microscopía electrónica se determinó un tamaño de $300 \times 200 \times 100$ nm.

El cápside se encuentra rodeando al nucleoide que es biconcavo y a los cuerpos laterales centrales situados sobre la concavidad del nucleoide (7).

Otros estudios revelan que la partícula viral tiene una porción central (nucleoide) densa que puede ser digerida por desoxirribonucleasa, previo tratamiento con pepsina. Estos cuerpos contienen

el ADN del virus, los cuales fueron descritos por Paschen en 1906 - y se vió que tenían una forma esférica de diámetro aproximado de - 250 nm.

Con la introducción de la tinción negativa para microscopía electrónica se ha observado que el cuerpo elemental viral (virión) aparece con estructura parecida a la mora a la cual se le ha llamado forma M o como una estructura más grande y encapsulada a la cual se le llama "forma C". Estas diferencias estructurales reflejan distintos grados de penetración del ácido fosfotúngstico.

En la forma M su estructura superficial es dentada y afilada. Estudios detallados han demostrado que esta estructura esta - constituida por hélices dobles huecas, de diámetro alrededor de 90 Å, muy probablemente de naturaleza lipoproteica puesto que son afectadas por solventes de lípidos.

La penetración del ácido fosfotúngstico dentro del virus revela algunas de las estructuras internas; en particular muestra al nucleoide de forma rectangular aplastada, cuyas superficies superior e inferior contienen concavidades en las cuales hay estructuras de naturaleza no conocida (7).

En células infectadas pueden observarse las inclusiones clásicas Cuerpos de Guarnieri, los cuales se encuentran en el citoplas-

ma de células epiteliales de la piel. Teñidos con Giemsa aparecen de color rojizo por su carácter eosinofílico. Inclusiones nucleares son descritas por Torres y algunos cuerpos irregulares eosinófilos - en células epiteliales son vistos raramente y no ocurren en células con cuerpos de inclusión (9).

COMPOSICION BIOQUIMICA

Recientes análisis del virus han dado valores similares a los encontrados por Smadel y Hoagland (10).

Estos autores encontraron 3-5% de ADN, 86% de proteínas, 1.4% de colesterol, 2.2% de fosfolípidos, 2.2% de grasas neutras, -- carbohidratos, cobre, flavina y biotina.

Zwartouw, en 1964 postuló que los lípidos son los componentes esenciales del virus, y sugirió que las pequeñas cantidades de cobre, flavina y biotina son impurezas (11).

El propio autor encontró 3.2% de ADN proporción menos probable que la de 5.6% determinada por Smadel, Hoagland y Joklik (12), y el valor de carbohidratos también es menor 0.2% en lugar de 2.8% encontrado por estos últimos.

El virus contiene proteínas que incluyen por la menos 2 enzimas virus-específicas; una ARN polimerasa dependiente del ADN y una nucleofosfohidrolasa. El lípido del virus parece ser virus-específico, lo cual difiere de lo observado en otros virus con envoltura - (13).

CUADRO N° 2

Componente del Virus	Zwartouw (1964)	Smadel y Hoagland (1942)
Componentes principales:	%	%
Nitrógeno	14.7	15.3
Fósforo	0.49	0.57
Azufre	0.76	
ADN	3.2	5.6
Colesterol	1.2	1.4
Fosfolípidos	2.1	2.2
Huellas de sustancias:		
Carbohidratos	0.2	2.8*
Cobre	0.02	0.05
Riboflavina	0.5×10^{-3}	1.3×10^{-3}
Biotina	1.3×10^{-5}	Presenté
ARN	0.1	

* Azúcares reducidos después de hidrólisis.

EFECTOS DE LOS AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

Este virus resiste la desecación, y puede recuperarse de — costras secas conservadas en cuartos fríos por muchos meses y de exudados guardados en frascos por muchas semanas. El virus seco resiste 10 minutos a 100°C. Las suspensiones de este virus son — inactivadas por calor a 60°C por 10 minutos. La luz ultravioleta, los rayos alfa, X y gamma tienen un efecto letal para el virus. Por otra parte, es sensible a la acción fotodinámica de varios colorantes en presencia de luz.

El virus es inactivado a pH de 3 durante una hora; el alcohol metílico y la acetona al 50% lo inactivan en una hora. Es resistente al éter etílico al 20% y a 4°C; resiste también la acción del fenol al 1% por semanas a 4°C, pero puede ser inactivado a 37°C en 24 horas, y es relativamente resistente a la acción del glicerol al 50%.

El virus no es destruído por ciertos desinfectantes que son bactericidas tales como el verde brillante en concentración de 1:10,000, pero si es inactivado por desinfectantes del tipo de los oxidantes como los hipocloritos, el permanganato de potasio en concentración de 1:10,000; el formaldehído en concentración de 0.2% destruye su infectividad en 24 horas (4).

REPLICACION EN SISTEMAS CELULARES

Los virus de este grupo tienen la facultad de multiplicarse en diversos sistemas celulares, los cuales comprenden tres tipos:

- a) Dermis de animales susceptibles.
- b) Membrana corioalantoidea de embriones de pollo
- c) Cultivos celulares.

La replicación de este virus sobre la dermis de ciertos animales susceptibles tales como carneros, terneras, búfalos está limitada solo a la producción de vacuna antivariolosa y nunca con fines de diagnóstico.

Casi todos los miembros de este grupo pueden replicarse y producir lesiones sobre la membrana corioalantoidea de embriones de 11 a 12 días, a una temperatura óptima de 35°- 36°C; el tamaño y el tiempo que tardan las lesiones en aparecer dependen de la cantidad de virus inoculado. Las lesiones son de color blanco grisáceo y consisten en una área de hiperplasia con necrosis central; al microscopio pueden observarse cuerpos de Guarnieri.

El comportamiento del virus sobre los embriones de pollo es de los pocos medios que existen para la diferenciación entre el virus de la viruela mayor y el del alastrim, ya que el virus de la viruela mayor sobrevive por un período más o menos largo en la -

membrana corioalantoidea, en tanto que el virus del alastrim no lo puede hacer. Los embiones inoculados con el virus sobre la membrana corioalantoidea son incubados a 38-38.5°C; el virus de la viruela mayor produce lesiones sobre la membrana, mientras que el virus del alastrim no las produce a esa misma temperatura.

El virus de la viruela tiene la facultad de replicarse y causar efectos citopatogénicos en cultivos celulares de una gran variedad de tejidos. Así pueden multiplicarse en fibroblastos y en células de riñón de pollo, como también en cultivos de células de diversos mamíferos (14 y 15). Se prefieren los cultivos en monocapa, como los de riñón de bovino, riñón de conejo, riñón de mono, tejidos embionarios humanos, células Hela, células L, células Hep-2, etc.

No producen cambios citopáticos característicos, aunque hay formación de células gigantes por fusión de células infectadas adyacentes. El tiempo que tarda en aparecer el efecto citopatogénico varía de acuerdo a la cantidad de virus inoculado; así en cultivos de células Hela inoculados con 10^3 unidades infecciosas en 5-6 días se producen pequeños focos heperplásicos que persisten uno ó dos días antes de la degeneración celular. Inóculos mayores pueden producir efectos citopatogénicos en 48-72 horas (16).

Las inclusiones citoplásmicas (cuerpos de Guarnieri) pueden demostrarse por tinción de células infectadas.

En cultivos celulares infectados, pueden ser demostrados antes de - que aparezcan cambios citopáricos por hemadsorción de eritrocitos de pollo añadidos al cultivo de tejido (17).

CARACTERISTICAS ANTIGENICAS

Los poxvirus tienen una estructura compleja y bastante similar entre sí. Contienen antígenos solubles, extraídos de células infectadas y separados de las partículas virales, antígenos virales, hemaglutininas y antígenos nucleoproteicos. Diferentes especies de poxvirus contienen componentes antigénicos comunes.

Los primeros trabajos de Craige y Wishart, seguidos por los de Smadel, establecieron el concepto de un antígeno proteico que es componente del antígeno viral y del antígeno soluble. Esta proteína lleva dos grupos prostéticos, uno de ellos termolábil y que ha sido llamado componente L, mientras que el otro es termoestable y se conoce como componente S; al complejo se le denomina LS, y es responsable de la floculación, precipitación y fijación de complemento demostrados en reacciones con preparaciones tipo de antígenos virales y solubles. El concepto de un antígeno LS único debe ser abandonado, ya que el complejo LS es un compuesto responsable de un gran número de antígenos proteicos (18).

En partículas virales purificadas se ha demostrado la presencia de antígenos nucleoproteicos y de un antígeno protector responsable de la neutralización de la infectividad, y de la inmunidad adquirida a la infección.

La estrecha relación antigénica del virus de viruela con otros poxvirus ha sido demostrada por fenómenos de reactivación y de recombinación. La relación serológica de algunos poxvirus puede ser demostrada cuando son inactivados por calor a 55-56°C y pueden ser reactivados cuando se inoculan en una mezcla con el virus de viruela activo en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. Si los embriones son incubados a temperatura superior a la de replicación del virus de viruela (38.5°C), las lesiones que aparecen tienen una alta proporción de virus híbridos (19).

Estudios detallados en este género Rondley y Dumbell en 1962 (20) han revelado cuantitativa, pero no cualitativamente, diferencias antigénicas entre los miembros del grupo. Igualmente la prueba de neutralización no es capaz de distinguir las especies individualmente.

Dos importantes consecuencias tiene el sistema de similitud antigénica entre estas especies:

- 1) No es posible por métodos serológicos distinguir entre miembros de uno u otro género, se ha hecho un límite al valor diagnóstico serológico en las infecciones humanas.
- 2) La aparente identidad de este antígeno protector ha hecho posible el uso del virus de la viruela del ganado y después el de vaccinia para ser usado en la vacunación contra la viruela.

DIFERENTES FORMAS CLINICAS DE LA INFECCION

INFECCION "IN UTERO" Y CONGENITA

En este tipo de infección el periodo de incubación es a menudo mas corto que en la infección natural adquirida posteriormente, en cuyo caso dicho periodo requiere 2 a 3 días más. Estos 2 ó 3 -- días tal vez representen el intervalo entre la implantación del virus en la mucosa del tracto respiratorio y su desiminación por vía sanguínea a los otros tejidos donde va a seguir multiplicándose (21). En algunos otros casos parece ser que el periodo de incubación es -- el mismo que para la infección natural.

El virus entra a la circulación fetal por la placenta y probablemente después de infectar a la células que separan la sangre -- materna de la fetal, y en el período de incubación debe multiplicarse en los tejidos internos del feto. En virtud de que parte de la san -- gre fetal pasa directamente de la vena umbilical al hígado, es probable que el virus llegue a la células de Kupffer desde el principio del período de incubación (22).

El aborto puede ser común porque hay tendencia a la hemo -- rragia intrauterina y puede aparecer toxemia. El feto puede escapar del aborto pero puede adquirir la infección en el útero al momento de que la infección ataca a la madre en presencia de viremia (23).

Cuando la infección se presenta al final del embarazo, el -- bebé

está propenso a desarrollar la infección clínica después de algunos días de nacido o puede adquirirla al momento de nacer cuando la infección se encuentra latente en la madre.

Se han registrado casos de bebés infectados intrauterinamente algunos días antes de nacer sin que la madre presentara signos clínicos de la infección (24, 25).

INFECCION ADQUIRIDA O POSNATAL

El periodo de incubación normalmente es de 12 y 13 días, pero algunas veces suele presentarse corto de 9 días o largo de 16 días.

Entre las manifestaciones clínicas hay una fase toxémica que puede durar 4-6 días y se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, dolor del cuerpo y postración; algunas veces puede presentarse vomito, muchas veces el malestar predomina en las ingles infartos ganglionares, las axilas y a los lados del cuerpo, y en otros casos puede presentarse tambien eritemia. Al tercero o cuarto día de la aparición de los síntomas descritos, aparece la erupción que se manifiesta primero en las mucosas bucal y faríngea, cara, antebrazos y manos, y más tarde se extiende al tronco y a la parte inferior del cuerpo, La erupción evoluciona a pápulas y despues de 2 ó 3 días éstas se convierten en vesículas, y poco más tarde pasan a pústulas.

Después de 8 ó 9 días de que apareció la erupción aparecen

costras que se completan alrededor de 14-16 días después de inicia da la infección. Al finalizar la tercera semana las costras se caen, con excepción de las de las palmas de las manos y de las plantas de los pies, en donde tardan más en desprenderse.

La erupción es más marcada en la cara, la cual puede presentar edema, y sobre los antebrazos y manos. La mayor severidad de la infección en la fase eruptiva es paralela a la aparición de la erupción en la piel (26). Cuando la erupción es completa sobre la cara y los brazos, las vesículas tienen una apariencia aplastada, se sienten suaves y muestran una forma definida y en tales casos Dixon considera que se trata de una infección maligna (27).

En algunos casos la infección va asociada con hemorragias. En la viruela hemorrágica primaria se presentan numerosos hemorragias en las ingles, axilas, cara y a los largo de todo el cuerpo, y ocurre la muerte poco después sin la aparición de una erupción focal (púrpura variolosa).

En otra variedad de la infección la hemorragia ocurre después de la aparición de un estado eruptivo (viruela pustulosa hemorrágica o viruela hemorrágica secundaria).

La viruela puede tener complicaciones, aunque raras, y entre ellas tenemos: abscesos, erisipela, úlcera corneal que puede producir ceguera, ostiomielitis y encefalitis (28).

TRANSMISION Y PATOGENIA

La puerta de entrada del virus de la viruela es la mucosa del tracto respiratorio superior, la cual atraviesa. Durante el periodo de incubación, el virus puede propagarse en el tejido linfático o en otros tejidos; como no hay lesión abierta en la mucosa durante el periodo de incubación, el paciente no es infeccioso durante esta fase. Se piensa que tiene lugar lo siguiente a partir de la entrada del virus: 1) multiplicación primaria del virus en los tejidos linfáticos que drenan el sitio de entrada; 2) viremia transitoria e infección de las células reticuloendoteliales en todo el cuerpo; 3) una fase secundaria de multiplicación en tales células, lo cual conduce; 4) una viremia secundaria más intensa y 5) a la manifestación clínica de la enfermedad.

La lesión cutánea es una consecuencia de la localización del virus en la epidermis a partir del torrente circulatorio. El virus puede ser aislado de la sangre en los primeros periodos de la enfermedad, pero no después del segundo día de la fiebre (excepto en los casos fatales). Se sostiene que la mejoría clínica que sigue al desarrollo de la erupción cutánea es debida a la rápida aparición de los anticuerpos. La transformación de la erupción cutánea en pústulas puede dar lugar a una fiebre secundaria; se cree que esto se debe a la absorción de los productos de la necrosis celular más que a una

infección bacteriana secundaria. Ni en los casos benignos ni en los severos es posible encontrar bacterias en la sangre durante la fase de viremia (febril pre-eruptiva). En los casos severos es posible encontrar bacterias en la sangre alrededor del 8o. al 12o. días de la enfermedad, durante la fase pustular. Las pústulas cutáneas se pueden contaminar generalmente por estafilococos, dando lugar algunas veces a diversas complicaciones por bacterias (ostiomielitis, artritis supurativa).

En el momento en que se presenta la erupción cutánea existe una gran cantidad de virus en la capa inferior de la epidermis; sin embargo, el virus no se esparce hasta que posteriormente se rompen las vesículas y las pústulas, debido a las características de impermeabilidad del tejido involucrado. En la boca y en la faringe esta capa protectora no existe, y las lesiones por lo tanto se abren pronto, haciendo que el líquido de orofaringe y la saliva se hagan infectivos con rapidez.

En el comienzo, la enfermedad (fase pre-eruptiva) es difícilmente infecciosa. En el 1o. ó 2o. día de la enfermedad, la saliva es negativa para el virus, pero del sexto al noveno día es casi siempre positiva. En este estadio las lesiones de la boca tienden a ulcerarse y a producir descargas de virus en la cavidad bucal. En el comienzo de la enfermedad, por tanto, los virus infecciosos tienen su fuente en las lesiones de la boca y de las vías respiratorias altas;

más tarde, las pústulas se abren, y los virus del ambiente que rodea a un enfermo de viruela proceden de esta fuente.

El examen histopatológico de la piel muestra que durante las primeras fases se presenta una proliferación del estrato espinoso, y que estas células contienen grandes cantidades de inclusiones cito--plásmicas. Hay una infiltración de células mononucleares, en parti--cular alrededor de los vasos de la dermis. Las células epiteliales de la capa de Malpigio se hinchan por la distensión de su protoplasma y sufren una degeneración de hinchazón. Las vacuolas del citoplasma aumentan de tamaño y distienden a la membrana celular, la cual finalmente se rompe, estableciéndose una coalescencia con las células vecinas, afectadas en forma parecida, y dando por resultado la formación de las vesículas. A medida que la enfermedad progresa, las vesículas se hacen mayores y se llenan de leucocitos y restos celulares. La capa basal es poco afectada en el alastrim, en tanto que en la viruela clásica todas las capas se ven afectadas, presentándose una verdadera necrosis de la dermis; es por tanto, que las lesiones dejan cicatrices en el caso de la viruela mayor y no en el caso del alastrim (29).

En el corazón, aparte de hemorragia subendocárdica son infrecuentes otros cambios patológicos. Switzer e Ikeda (30) han considerado a la bronconeumonía como causa de muerte en algunos pacientes, y otros autores también han reportado bronquitis y bronco-

neumonías bacterianas como causa de la muerte.

En 177 autopsias, Brass (31) encontró hiperemia y en 25 - bronconeumonías como causas de muerte. El hígado se encuentra aumentado, hay hemorragias ocasionales, pero no se observan grandes cambios; el bazo se encuentra a su vez aumentado de tamaño y congestionado. En el riñón hay dilatación de los canales y se observa degeneración de células epiteliales encontradas alrededor de la zona piramidal.

VIRUELA

MULTIPLICACION EN LA FARINGE

INHALACION DEL VIRUS

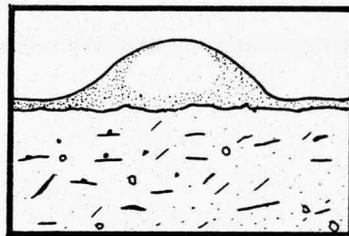
EXTIENDE A LINFATICOS CERVICALES GLANDULAS Y A CAVIDADES

VIREMIA

VIRUS DE VIRUELA EN LA DERMIS

HIGADO

BAZO



FORMACION DE VESICULAS

RESPUESTA INMUNOLOGICA

Los niños nacen con anticuerpos maternos, los cuales se pierden durante los primeros meses de la vida; es entonces cuando es necesario provocar la inmunidad artificial mediante la vacunación. La inmunidad puede demostrarse a los 8 ó 9 días después de la va cunación, alcanzando su máximo 2 a 3 semanas más tarde, y se man tiene a niveles apreciables durante unos cuantos años (3 a 5 habitual mente).

La vacunación durante la lactancia puede ser responsable de la benignidad de la enfermedad en la vida posterior. En las zonas endémicas la vacunación debe repetirse cuando menos cada año; debe repetirse también anualmente en aquellas personas expuestas al contagio, entre las cuales se encuentran el personal encargado de establecer las cuarentenas, los empleados de las aduanas, los oficiales sanitarios y las personas que trabajan en hospitales que reci ben pacientes con enfermedades infecciosas.

La respuesta inmune específica se debe a la aparición de an ticuerpos. En el suero el principal anticuerpo es de tipo inmunoglobulina G, y en las excreciones corresponde a inmunoglobulina A. Los anticuerpos IgA de las secreciones duran mucho menos que los anticuerpos IgG del suero. Se ignora el papel de las inmunoglobulinas E de las secreciones, pero podrían amplificar la resp uesta in mune durante la infección (32).

EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL

La viruela es una enfermedad muy contagiosa que puede adquirirse por contacto directo o indirecto a través de utensilios, ropa de vestir o polvo infectado por pacientes; estos no presentan un potencial infeccioso durante el período de incubación sino hasta la aparición de la erupción.

Por la gran resistencia natural que el virus presenta, la infección puede ser transmitida por ropa de cama; en el brote de viruela ocurrido en Inglaterra en 1950, la introducción del virus fue atribuida a la importación de algodón, por lo que se ha estudiado la supervivencia del virus en costras tapadas con algodón y expuestas a temperaturas de 30°-40°C ó más, y se ha visto que el virus no sobrevive más de 6 meses, pero a temperaturas de 20°-25°C el virus se conserva activo hasta por 17 meses. Otras pruebas que se han hecho es dejar almacenar polvo en una habitación donde estuvo un paciente que padeció viruela y después de un año se ha removido ese polvo, encontrándose el virus activo. En costras secas el virus sobrevive por muchos años en refrigeración.

En condiciones primitivas de hospitalización el peligro de diseminación de la enfermedad es muy elevado. En países tropicales, las moscas, las hormigas y otros insectos pueden ser también factores de diseminación.

Aun en hospitales modernos bien acondicionados y con buenos

recursos, son necesarias las más estrictas medidas de desinfección por la frecuencia con que trabajadores de lavandería y personal que maneja ropa de cama de casos de viruela llegan ellos mismos a contaminarse. Es también un peligro para la diseminación de la enfermedad el uso de extractores de aire en los hospitales, a menos que estén dotados de filtros absolutos.

Las medidas profilácticas para el control de la viruela difieren considerablemente según las características epidemiológicas que presenta en una región o país. Debido a que en la actualidad ésta enfermedad está confinada a unas cuantas zonas endémicas en Etiopía (33), donde hasta el 12 de marzo de 1976 quedaban 51 poblados infectados, y a que en forma de brotes epidémicos se han presentado también en 1976 casos de viruela en la región de Begemdir en las riberas del Nilo Azul y entre nómadas del desierto de Ogaden, no hay razón para referirse con mayores detalles a los métodos de control que se utilizan en tales circunstancias.

En el caso de regiones o países donde la viruela fué erradicada hace muchos años, como ha sucedido en México, la única precaución en vigor es la vacunación, recomendándose la primo-vacunación alrededor del año de edad (dando así oportunidad a la aplicación más oportuna de otros agentes inmunizantes más indispensables como son las vacunas contra la polio, sarampión, DPT y tuberculosis) y revacunaciones cada 3 a 5 años como máximo. Es bien sabido, sin

embargo, que con gran frecuencia la vacuna antivariolosa es apli cada durante los primeros meses de vida. De acuerdo con las es tadísticas oficiales tanto de las autoridades sanitarias de nuestro país como de la Organización Mundial de la Salud, según las cua les no se ha presentado un solo caso de viruela desde hace más de 20 años, habría que réconocer la efectividad de las medidas de pre vención adoptadas por las autoridades responsables.

VACUNACION ANTIVARIOLOSA

El virus para la vacunación se prepara a partir de las lesiones vesiculares (linfa) producidas en la piel de terneros o de carneros. Algunas experiencias sugieren que puede obtenerse una preparación igualmente buena del virus a partir de cultivos de tejidos de embriones bovinos; los virus son cosechados en condiciones de esterilidad bacteriológica. El producto final contiene 40% de glicerol y 0.4% de fenol para destruir a los contaminantes bacterianos, y además para evitar la congelación de la vacuna durante su almacenamiento a -10°C . La vacuna de linfa de ternera de buena potencia deberá contener aproximadamente 10^8 unidades infecciosas/ml.

Se ha logrado la preparación del virus de la vacuna liofilizada y estable a partir de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. Esta debe ser reconstituida con un diluyente que ejerza un efecto protector hacia el virus, así como poca o ninguna capacidad de sensibilizar a las personas que van a ser vacunadas; con este objeto se emplea una solución al 5% de peptona.

Existe también una vacuna preparada en células renales de conejo, las cuales se hacen crecer en botellas, a 37°C por 7 a 8 días, al término de los cuales se inoculan con el virus y a los 3 ó 4 días de incubación el virus llega a su máximo de replicación; la cosecha viral puede concentrarse si es necesario, y una vez ajustada su potencia se liofiliza previa adición de un estabilizador (5% de

peptona y 5% de sorbitol).

En condiciones de refrigeración ordinaria este producto es bastante estable. La vacuna preparada por este método mantiene su viabilidad cuando se guarda a 37°C por muchas semanas, y se observa también reproducibilidad de resultados en pruebas hechas en diferentes lotes (34).

Más recientemente Mettier y Col. (35) desarrollaron una vacuna tipo unguento en la cual primero se trata el virus de vacuna liofilizado con aceite de silicones de alta viscosidad. La incorporación del aceite de silicones ha mostrado proteger la virus de cambios atmosféricos y mantener su estabilidad. Este tipo de vacuna ofrece la ventaja de que es menos dolorosa para los niños.

El método a elección para la vacunación es el de presión múltiple sobre la piel del brazo. Las reacciones resultantes de la vacunación pueden ser de 3 tipos: a) Primaria, b) Vaccinoide o acelerada, c) Temprana o inmediata.

- a) La reacción primaria: es la que presenta una persona que no ha tenido contacto previo con el virus de la viruela.
- b) La reacción vaccinoide o acelerada: es una reacción modificada en personas que tienen una inmunidad residual por ataque previo de viruela o por vacunación.
- c) La reacción inmediata o temprana: es una indicación de susceptibilidad o de inmunidad a la viruela.

COMPLICACIONES DE LA VACUNACION PRIMARIA

La revacunación rara vez se acompaña de efectos adversos, pero en la vacunación primaria pueden presentarse tipos de complicaciones serias, siendo todas ellas raras.

- a) La encefalitis posvacunal: es la complicación más grave de la vacunación antivariolosa. En la cual disminuye el riesgo en forma inversa a la edad del paciente.
- b) La vacuna gangrenosa (*vaccinia necrosum*): es una enfermedad muy rara, que está asociada con anomalías de la respuesta inmune.
- c) Eczema vaccinatum: se presenta en personas que su frenal eccema y se presenta ya sea como una complicación de la vacunación o por infección por contacto con personas recientemente vacunadas.
- d) El aborto: puede presentarse en mujeres embarazadas debido a la infección intrauterina del feto. Por lo tanto, el embarazo es una contraindicación a la vacunación, la cual solo se usara cuando existan razones que obliguen a vacunar contra la enfermedad.

TRATAMIENTO DE LA VIRUELA

Los antibióticos combaten en forma satisfactoria la infección bacteriana secundaria, lo cual favorece la subsecuente cicatrización, pero no reducen la mortalidad en forma significativa.

La metisazona (I-metilisatin- B -tiosemicarbazona) previene la multiplicación del virus de viruela si se administra antes de que la enfermedad se desarrolle, pero su uso como tratamiento de casos establecidos de viruela es bastante decepcionante. Este medicamento puede tener algún uso en la vacuna generalizada aunque los resultados no han sido muy alentadores . Se han sugerido también la inmunoglobulina antivacuna o los leucocitos de donadores inmunes como tratamiento "heroico" en la vacuna gangrenosa, pero no se conoce tratamiento específico para la encefalitis postvacunal (13).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En la mayoría de los casos de viruela el diagnóstico puede ser hecho rápidamente por el cuadro clínico y para corroborar por el aislamiento del virus y por la demostración de un aumento en el título de los anticuerpos específicos durante el curso de la infección.

Para el aislamiento del virus los procedimientos que se han hecho con éxito son: a) examen de material de lesiones de la piel y de las mucosas por microscopia directa, observándose cuerpos de Guarnieri (cuerpos de inclusión citoplásmica eosinófilos), b) por inoculación de material de la sangre o de lesiones de la piel en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo o en cultivo de tejido.

Los anticuerpos pueden ser detectados alrededor del sexto día de la enfermedad, aún en los casos en los que ha habido vacunación previa. Estos anticuerpos séricos pueden ser estimados por varios métodos incluyendo:

- a) Precipitación en gel-agar: un resultado positivo se muestra por la aparición en pocas horas de una línea de precipitación entre el pozo conteniendo el suero del paciente y el antígeno. Esta prueba no es cuantitativa pero es útil cuando da resultados positivos.
- b) Fijación de complemento: por esta prueba títulos de 1:10

o más altos en personas con viruela no vacunadas es indicio de infección. Anticuerpos obtenidos por fijación de complemento en pacientes vacunados es raro detectarlos 6-12 meses más tarde.

- c) Pruebas de neutralización: varios métodos han sido introducidos para determinar la actividad neutralizante del suero, existiendo 2 variantes: 1) neutralización en membrana corioalantoidea, 2) neutralización en cultivo de tejido; ambos dan resultados muy satisfactorios.

El cultivo de tejidos invitro fue empleado por primera vez hacia 1913, utilizándose con éxito para la propagación del virus de vaccinia (36) y en la preparación de la vacuna contra la viruela (37). Sin embargo, fue hasta 1950 con el descubrimiento de Enders y colaboradores cuando se estimuló extensamente el uso del cultivo de tejidos para el estudio de virus animales y humanos. Un hecho importante en el uso de cultivo de tejidos lo constituyó la inclusión de los antibióticos y antimicóticos en el medio nutritivo, como lo fue también el desarrollo de medios químicamente definidos sin sustancias inhibitoras de la actividad viral.

En virología el uso de cultivos de tejidos ha tenido numerosas ventajas: son más fácilmente manejables en pruebas de neutralización y propagación, ya que requieren de menos espacio, menos animales o embriones por lo tanto menos atención hacia ellos, por

lo que hoy en día es más usual trabajar con cultivos de tejidos.

Otra ventaja que nos trae el uso del cultivo de tejidos es - que permite obtener títulos altos en la propagación de agentes virales y proporciona material libre de contaminantes, lo cual es muy importante en la preparación de vacunas y antígenos serológicos.

PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO DE LA VIRUELA

Fase de la enfermedad	Material que debe ser examinado	Observación microscópica de frotis de las lesiones cutáneas.	Cultivo en MCA del embrión de pollo o en C.T.	Descubrimiento del Ag. por difusión en gel de agar o fij. de complemento.	Descubrimiento del Ac.
Pre-eruptiva.	Sangre	Se observan cuerpos de guarnieri.	Puede ser positivo.	Puede ser positivo	Generalmente negativo.
Macular y Papular	Frotis de las lesiones cutáneas.	Se observan cuerpos de guarnieri.	Generalmente - positivo.	Puede ser positivo	
Vesicular	Líqu. de las vesículas y frotis de la base de las vesículas	Se observan cuerpos de guarnieri.	Generalmente - positivo.	Generalmente positivo.	
Pústular	Líqu. de las pústulas. Sangre	Se observan cuerpos de guarnieri.	Generalmente - positivo.	Generalmente positivo	Puede ser positivo
Formación de costras	Costras Sangre	No se observan - cuerpos de guarnieri.	Generalmente - positivo.	Generalmente positivo.	Generalmente positivo.
Mas tarde	Sangre				Generalmente positivo.
Tiempo necesario para la prueba		1 hora	1 - 3 días	3 - 24 horas	3 - 24 horas

GENERALIDADES SOBRE LA PRUEBA DE
NEUTRALIZACION

Esta prueba ésta basada en el principio de que cuando un sue
ro específico inmune es adicionado a su correspondiente virus, el vi
rus es neutralizado en su infectividad. Los sistemas empleados son
huevos embrionados, varias especies animales y cultivos de tejido.

El mecanismo preciso de la neutralización viral por los anti-
cuerpos específicos continúa sin entenderse completamente. El efec-
to más importante de los anticuerpos neutralizantes es prevenir la -
adsorción de los viriones a las células, por obstáculo estérico. Los
anticuerpos, adheridos por ambos sitios de unión en la superficie del
virión, pueden distorcionar la configuración de la envoltura viral lo
suficiente como para alterar los procesos normales de adhesión.

El virus intracelular está protegido de los anticuerpos presen-
tes en el plasma circulante o en los líquidos tisulares. Algunos vi-
rus, como el virus de la viruela, al ser liberados de la superficie
de la célula en la que se están replicando quedan expuestos a la ac-
ción de los anticuerpos neutralizantes.

Para la titulación de anticuerpos neutralizantes en el laborato-
rio, se ha convenido internacionalmente utilizar una cantidad constan-
te de virus, generalmente 100 DICT₅₀ para cada dilución de suero.

OTRAS PRUEBAS DE NEUTRALIZACION

Aparte de la prueba de microtitulación aquí descrita, existen algunas otras cuyo fundamento es el mismo, solo con algunas variantes.

PRUEBA DE NEUTRALIZACION EN CULTIVO DE TEJIDO EN TUBO:

Esta prueba es similar a la ya descrita, sólo que para realizarla se necesita más material tanto biológico como de vidrio, así como más espacio para realizar la incubación y, lo más importante, es menos rápida de realizar y de interpretar los resultados.

PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACAS:

Mezclas de virus-suero pueden ser inoculadas en la monocapa de tejido; la cual se fija luego cubriéndola con agar. En esta prueba la actividad neutralizante del suero es determinada por su capacidad para reducir el número de placas virales, comparando con placas inoculadas con el virus sólo. Una reducción de 80% es considerada como significativa, es decir, el suero contiene anticuerpos específicos.

PRUEBA DE NEUTRALIZACION COLORIMETRICA O DE INHIBICION DEL METABOLISMO.

Esta prueba se base en el hecho de que el CO₂ producido por

el metabolismo de las células ocasiona cambios de pH en el medio de cultivo celular. Uno de los inconvenientes de esta técnica es la presencia de colores intermedios del indicador (rojo de fenol), lo cual dificulta la interpretación.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 479 muestras de sueros obtenidos de niños que acuden a la Sección de Toma de Productos del Servicio de Laboratorios para alguna prueba rutinaria, en aquellos casos en que es posible obtener una pequeña cantidad adicional de sangre, e independientemente de que hayan sido vacunados o no contra la viruela. Estas muestras corresponden a los siguientes grupos de edad: de 0 a 6 meses, 7 a 12 meses, 1 año cumplido 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 años.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó la línea celular Hep-2 establecida por Toolan en 1952 (38), la cual se obtuvo de tumores producidos en ratas destetadas, irradiadas y tratadas con cortisona, después de inyectarlas con tejido canceroso de la laringe de una mujer de 56 años.

El desarrollo "in-vitro" se hizo en sueros humanos y de caballo y soluciones salinas balanceadas. Se ha visto que es una línea bastante estable a cambios nutricionales y de temperatura, sin perder viabilidad. Esta línea celular puede obtenerse de American Type Culture Collection y en laboratorios de Virología, laboratorios de Biología Celular y laboratorios de Producción de Vacunas Antivirales. Para no perder en un momento dado la línea celular en el

laboratorio, es conveniente tener ampollitas de suspensión celular adicionadas de glicerina en nitrógeno líquido, para recuperar la línea en el momento que sea necesario.

Para el desarrollo del trabajo la línea Hep-2, que habitualmente se cultiva en medio M-199 descrito por Morgan y colaboradores en 1951 (39), más 8% de suero de ternera y 2% de una mezcla de antibióticos, fue necesario adaptarla al medio de Leibovitz (40) más 6% de suero de ternera y 2% de la mezcla de antibióticos.

Dicha adaptación tiene por objeto evitar el uso de incubadora de CO₂ que se requiere en la técnica original usando medios con bicarbonato; ésta incubación en medio de CO₂ es necesaria para evitar que se alcalinice el medio donde se está llevando a cabo la prueba y nos pueda dar falsos resultados porque las células mueran. La adaptación se logró sin dificultad realizándose 2 ó 3 subcultivos antes de utilizar el cultivo en la prueba, con el fin de lograr una adaptación completa.

CEPA VIRAL

MATERIAL NECESARIO:

- a) Botella de leche con cultivo de células Hep-2
- b) Tubo estéril de centrifuga.
- c) Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

La cepa viral que se utilizó en las pruebas de neutralización fue obtenida a partir de un tubo capilar con vacuna antivariolosa preparada en México por el Instituto Nacional de Higiene.

1) El contenido del tubo capilar fue inoculado en una botella de cultivo con células Hep-2, y éstas se llevaron a incubación a 35°C hasta desarrollo completo del efecto citopatogénico.

2) Después de congelar ese material, para liberar las -- partículas virales, se cosechó en un tubo estéril de centrifuga y -- se eliminaron los restos celulares por contrifugación en frío a 1500 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante claro fue distribuido en alícuotas de 1 ml para proceder a su titulación.

PREPARACION DEL ANTIGENO VIRAL

MATERIAL NECESARIO:

- a) Botella de leche con cultivo de células Hep-2
- b) Cepa viral.
- c) Pipetas graduadas
- d) Tubos de centrifuga estériles.
- e) Pipetas Pasteur
- f) Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

- 1) Seleccionar al microscopio una botella cuyo tejido se encuentre en buenas condiciones y la capa celular esté completa.
- 2) Inocular 0.2 ml de la cepa viral que se va a replicar en el cultivo previamente seleccionado.
- 3) Inocular a 37°C durante 2 ó 3 días, observándose diariamente hasta ver que el efecto citopatogénico sea completo.
- 4) Congelar la botella mínimo un día, con el objeto de que las células se lisen y dejen en libertad las partículas virales.
- 5) Descongelar la botella y centrifugar el medio en tubos de centrifuga previamente esterilizados, a 1500 rpm durante 20 minutos en centrífuga refrigerada a -2°C, el sobrenadante es el que contiene las partículas virales, el sedimento corresponde a restos celulares.
- 6) Separar el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril y a su vez distribuirlo en varias alícuotas de 1 ml cada una en tu-

bos de ensaye de 13 x 100 mm, también previamente -
esterilizados.

- 7) Los tubos con virus se guardan en congelación a -70°C -
su posterior titulación.

La titulación del virus comprende tres pasos a seguir:

- 1) Preparación de la suspensión viral.
- 2) Conteo de células.
- 3) Titulación del virus.

PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR

MATERIAL NECESARIO:

- a) Botella de leche con cultivo de células Hep-2
 - b) Medio de Leibovitz con 6% de suero de ternera y 2% de antibióticos.
 - c) Tripsina-verseno.
 - d) Pipetas graduadas.
- 1) Seleccionar al microscopio la botella que se va a utilizar - observando que el tejido se encuentre en perfectas condiciones.
 - 2) Desechar el medio que contiene la botella.
 - 3) Agregar 2 ml de una mezcla de tripsina-verseno de la siguiente composición

Tripsina (1 250)	0.25 G
Verseno (EDTA disódico)	0.02 g
PBS (Dulbecco)	Cbp. 100 ml

Esterilizar por filtración y guardar a -20°C
 - 4) Después de 1-2 minutos a temperatura de 37°C decantar la tripsina-verseno y agregar otros 0.5 ml de tripsina-verseno nueva.

- 5) Colocar en la estufa hasta el desprendimiento total de la -
capa celular.
- 6) Agregar 3.5 ml de medio de Leibovitz (L-15 más 2% de -
antibióticos), para la disgregación total de las células por
medio de pipeteo continuo y enérgico.
- 7) Ya lograda una suspensión unicelular se pasa al conteo de
células.

CONTEO DE CELULAS

MATERIAL NECESARIO:

- a) Suspensión unicelular de células Hep-2
 - b) Rojo neutro diluido 1:500 en solución de Hanks.
 - c) Tubo de ensaye de 13 x 100 mm.
 - d) Pipeta Pasteur.
 - e) Cámara de Newbauer.
- 1) En un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. medir 0.8 ml de - la suspensión unicelular obtenida en el paso anterior, agreg ar 0.2 ml. de rojo neutro diluido 1:500.
 - 2) Agitar vigorosamente y dejar reposar 5 minutos.
 - 3) Con una pipeta Pasteur llenar la cámara cuenta glóbulos.
 - 4) Esperar 1-2 minutos y contar las células en los 5 cuadros grandes incluyendo las células que se encuentren sobre las líneas de arriba y de la derecha. Los núcleos de las células viables se tiñen de rojo.
 - 5) El cálculo se hace de la manera siguiente:

$$\frac{\text{Número de células en los 5 cuadros.} \times \text{Dilución inicial} \times 2000}{\text{Números de células deseadas/ml}} =$$

Volumen final a que se debe llevar la dilución inicial para tener la concentración de células deseadas/ml.

TITULACION DEL VIRUS

MATERIAL NECESARIO:

- 1) Placas desechables de vinilo, de 96 cavidades, con fondo (Limbro). Las placas requieren de un tratamiento previo, que consiste en lo siguiente: las placas son colocadas en un recipiente con alcohol etílico Q.P. al 70% de manera que sean bañadas totalmente durante 24 horas mínimo, al término de las cuales se lavan perfectamente con agua de la llave unas 10 a 15 veces , y después con agua destilada más o menos las mismas veces; se dejan secar perfectamente y se colocan bajo la campana de luz ultravioleta cuando menos por 4 horas. Después se guardan en bolsas de polietileno también esterilizadas para su posterior utilización.
- 2) Pipetas de polietileno con punta calibrada (Cooke Engineering CO) de 0.025 ml, esterilizadas en autoclave.
- 3) Microdilutores (Limbro) de 0.025 ml esterilizados a la flama.
- 4) Medio de Leibovitz con 6% de suero de ternera (S.T.) adicionado de 2% de antibióticos (penicilina-estreptomina) previa esterilización por filtración.

- 5) Suspensión de células Hep-2, conteniendo 400,000 celulas/ml.

Todo el material utilizado debe manejarse bajo rigurosa --
asépsia, para lo cual se utilizó una cámara de flujo laminar.

TITULACION DE LA SUSPENSION VIRAL

- 1) Colocar 2 gotas (0.050 ml) de medio diluyente (L-15 más 2% de antibióticos) en cada una de las cavidades de la placa, - usando pipeta calibrada de 0.025 ml.
- 2) Agregar una gota de la suspensión viral que se va a titular en las cavidades de la fila A, con pipeta calibrada.
- 3) Sumergir los microdilutores de 0.025 ml en las cavidades de la fila A, y mezclar rotando de 10 a 15 veces.
- 4) Pasar los microdilutores a la fila B y mezclar en la misma forma.
- 5) Repetir la misma operación hasta la fila H.
- 6) Después de mezclar en la fila H, sacar los microdilutores y secarlos con papel absorbente, enjuagar con agua destilada, después con alcohol y finalmente pasarlos por la flama hasta el rojo .
- 7) Agregar 2 gotas (0.050 ml) de la suspensión de células Hep-2 (400,000 cél./ml) a cada una de las cavidades de la placa.
- 8) Las placas se cubren con papel plástico transparente flexible y se colocan en charolas cuyo fondo tenga un lienzo húmedo; se cubren con otra charola invertida y se incuban a 35°C durante 7 días.
- 9) Al término del período de incubación, cada cavidad se observa al microscopio para detectar el efecto citopatogénico típico del virus; las cavidades que muestran dicho efecto se consideran

positivas. Para mayor seguridad en los datos, las placas se observaron cada tercer día.

- 10) Se hicieron testigos positivos y testigo de células para detectar cualquier citotoxicidad que pudiera contener el suero lo cual implicaría un efecto citopatogénico debido al suero y no al antígeno.

CALCULOS PARA DETERMINAR EL TITULO DEL VIRUS

En biología cuantitativa, el punto final es usualmente tomado como la dilución a la cual el 50% de los animales de prueba ha muerto. Cuando se utilizan cultivos celulares para cuantificar la infectividad viral, el concepto $DICT_{50}$ (dosis infectantes para cultivo de tejido al 50%) representa la cantidad de virus capaz de producir efecto citopatogénico en el 50% de los cultivos.

La fórmula utilizada por Kärber (41) para calcular el título de una suspensión viral es la siguiente:

$$\text{Log. de título} = \text{Log. de la dil. más baja} \left[\frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \frac{P_3}{T_3} + \dots - 0.5 \right] \text{ log. de la dil.}$$

donde:

$$P_1/T_1 = \frac{\text{Número de cavidades positivas}}{\text{Número total de cavidades inoculadas.}} \quad (\text{en cada dil.})$$

ejemplo:

Dil. del virus	P/T
$10^{-4.5}$	5/5
$10^{-5.0}$	5/5
$10^{-5.5}$	5/5
$10^{-6.0}$	4/5
$10^{-6.5}$	0/5
$10^{-7.0}$	2/5
$10^{-7.5}$	0/5
$10^{-8.0}$	0/5

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = -4.5 \left[\frac{5}{5} + \frac{5}{5} + \frac{5}{5} + \frac{4}{5} + \frac{0}{5} + \frac{2}{5} + \frac{0}{5} + \frac{0}{5} - 0.5 \right] 0.5$$

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = 4.5 \left[1 + 1 + 1 + 0.8 + 0 + 0.4 + 0 + 0 - 0.5 \right] 0.5$$

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = -4.5 \left[4.2 - 0.5 \right] 0.5$$

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = -4.5 \left[3.7 \right] 0.5$$

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = -4.5 \left[1.85 \right]$$

$$\begin{array}{l} \text{Log. del} \\ \text{título.} \end{array} = -6.35$$

MATERIAL NECESARIO PARA LA PRUEBA DE
NEUTRALIZACION

Se utiliza el mismo que se empleó para la titulación del vi
rus.

CALCULOS QUE SE EMPLEAN PARA DETERMINAR
LA DILUCION QUE SE NECESITA DEL VIRUS PARA
TENER LA DOSIS INFECTIVA DESEADA.

Título del virus - log. de 200

Donde 200 es el número de dosis infectivas que se necesitan,
que se reducen a 100 DICT₅₀ al mezclarse con un volumen igual de
suero.

- Antilog. de la mantisa de la resta anterior = X

1:X = Dilución que se necesita hacer del virus para obtener
las 200 DICT₅₀ por unidad de volumen.

ejemplo:

Título del virus - 6.35

Log. de 200 - 2.3
 - 4.05

Antilog. de 0.05 = 0.1122

Dilución que se necesita = 1: 11,000

Manera de hacer la dilución:

VIRUS	DILUYENTE	DIL. FINAL
1.0 ml	0.1 ml	1: 1.1
0.2 ml (Dil. 1: 1.1)	1.8 ml	1: 11
0.2 ml (Dil. 1: 11)	1.8 ml	1: 110
0.2 ml (Dil. 1: 110)	1.8 ml	1: 1100
0.2 ml (Dil. 1: 1100)	1.8 ml	1: 11,000

PRUEBA DE NEUTRALIZACION

- 1) El suero es inactivado por calentamiento a 56°C por 30 minutos con el objeto de eliminar inhibidores inespecíficos termolábiles.
- 2) Colocar 3 gotas (0.075 ml) del medio diluyente en el total de las cavidades de la placa usando pipeta con punta calibrada.
- 3) Colocar 1 gota (0.025 ml) del suero que se desea titular en dos cavidades de la fila A.
- 4) Sumergir los microdilutores estériles en las cavidades donde se colocó el suero, mezclar con movimientos rotatorios de 10 a 15 veces, teniéndose así una dilución 1:4.
- 5) Pasar los microdilutores a la fila B y mezclar en la misma forma, obteniéndose una dilución 1:16.
- 6) Hacer lo mismo en la fila C, teniéndose una dilución 1:64, y para la fila D una dilución 1:256.
- 7) Descargar los microdilutores, enjuagar con agua destilada, sumergir en alcohol y pasar por la flama.
- 8) A cada dilución agregar una cantidad constante de virus, para este caso 200 DICT₅₀, de tal manera que la concentra-ción final del virus sea de 100 DICT₅₀.
- 9) Mezclar con cuidado el contenido y dejar las placas a tempe-ratura ambiente por una hora para que se realice la neutra-lización del virus.

- 10) Al término del tiempo, agregar 1 gota de la suspensión de células Hep-2.
- 11) Cubrir las placas con papel transparente flexible y previamente esterilizado.
- 12) Colocar las placas en charolas con fondo húmedo y tapadas e incubar a 35°C durante 7 días.

Con el objeto de tener la seguridad de haber utilizado la cantidad adecuada de virus, en cada prueba se efectúa la titulación de la dilución con la que se trabajó, la misma forma que se describió anteriormente.

La observación de la placas al microscopio invertido para detectar el efecto citopatogénico se hizo cada tercer día, a partir de montada la prueba, hasta completar 7 días. En las cavidades — donde el virus fue neutralizado por anticuerpos específicos, las células formaron una capa confluyente observable con un aumento de 80 veces (microscopio Zeiss invertido, ocular 8x, objetivo 10/0.22).

En células Hep-2 el virus de vaccinia produce ECP que se caracteriza por células redondas, de mayor tamaño que las normales, turgentes, con membrana gruesa, al principio agrupadas como racimos; al cabo de 4-5 días la destrucción es prácticamente total.

Para la determinación cuantitativa se consideraron negativas las diluciones que no mostraron efecto citopatogénico, siendo el título de anticuerpos específicos la máxima dilución a la cual no se observó efecto citopatogénico.

Para un mejor entendimiento observar el esquema 1 y 2, así como la Figura 1.

Es de hacerse notar que para fines de interpretación se ha tomado la dilución 1:4 como negativa, ya que se considera que un título así es demasiado bajo por la técnica de neutralización.

ESQUEMA N° 1

INTERPRETACION DE RESULTADOS

TITULO DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS

DILU- CION.	S ₁	S ₁	S ₂	S ₂	S ₃	S ₃	S ₄	S ₄	TESTIGO DE CELULAS	
1:4	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
1:16	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖
1:64	⊖	⊖	⊖	⊖	+	⊖	+	+	⊖	⊖
1:256	⊖	⊖	+	+	+	+	+	+	⊖	⊖
TITULO	1:256		1:128		1:64		1:16			

+ CELULAS CON ECP
 - CELULAS SIN ECP

ESQUEMA Nº 2

ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA TECNICA DE NEUTRALIZACION

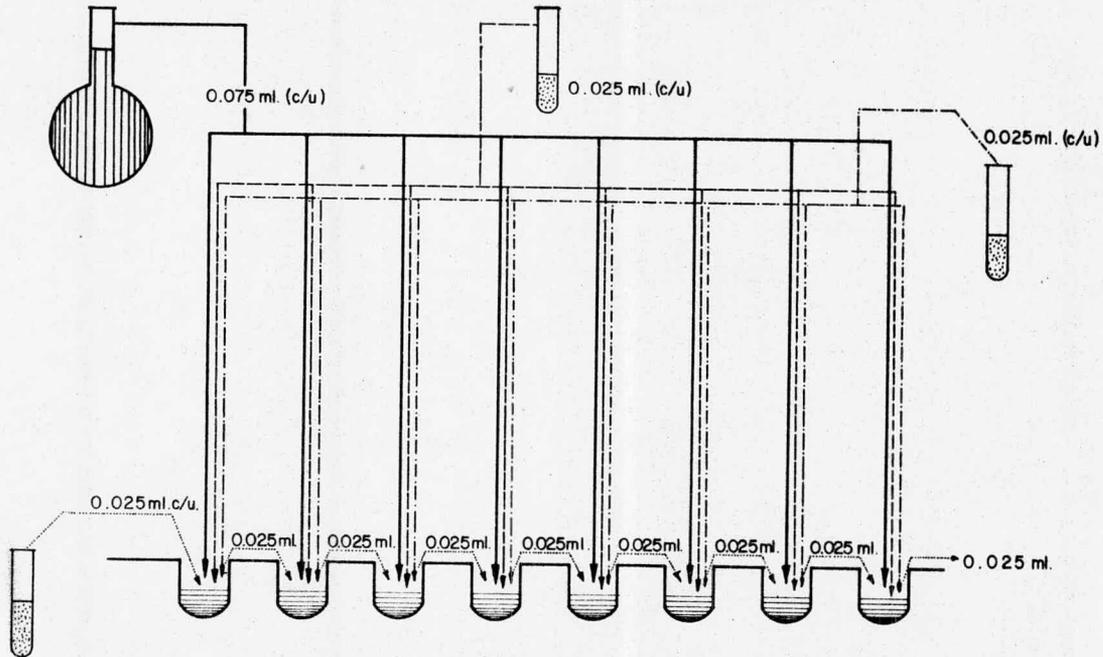
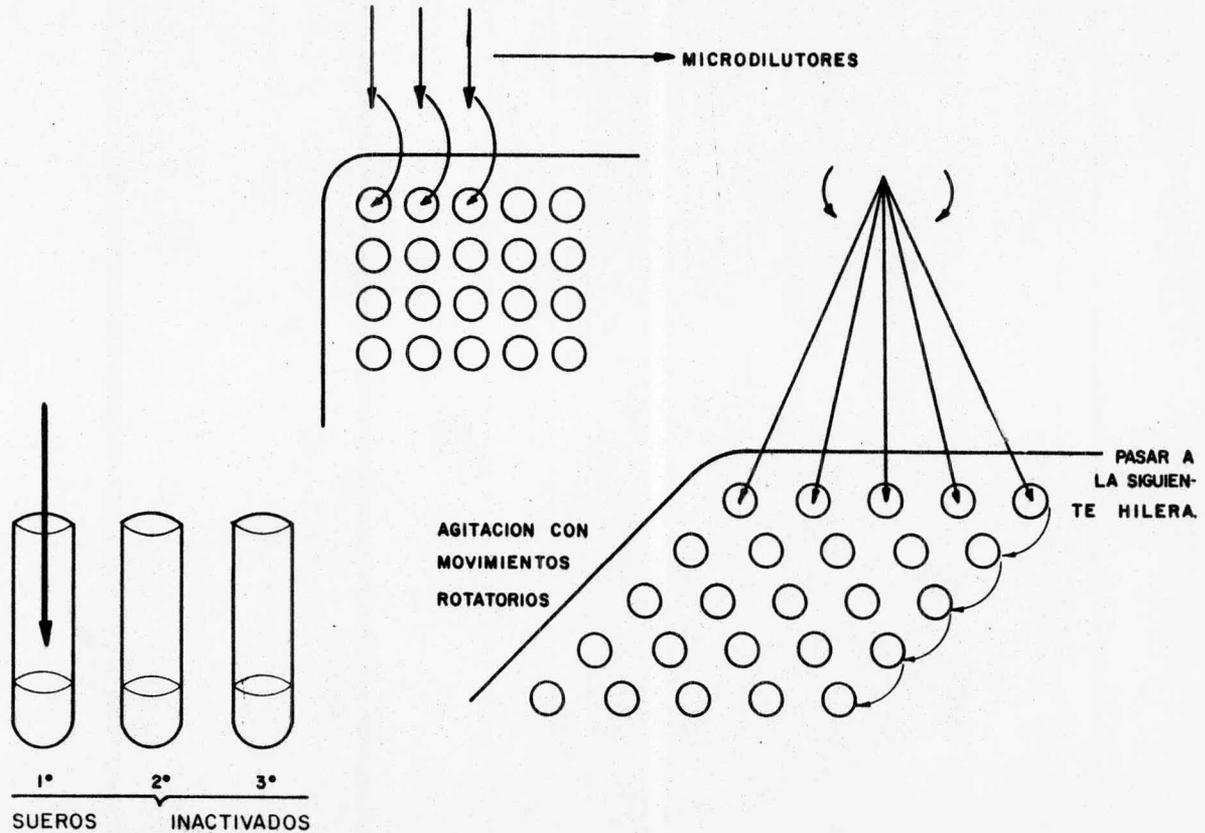


FIGURA N° 1

ESQUEMA DE LA MANIPULACION PARA LA TECNICA DE NEUTRALIZACION



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

El convencimiento de que la viruela será la primera enfermedad infecciosa erradicada de la tierra se basa en la convicción, sostenida por la Organización Mundial de la Salud, de que la disminución en el número de casos se ha sostenido en una forma muy significativa desde hace no menos de 10 años. De hecho la Asamblea Mundial de la Salud decidió en 1958, por primera vez, erradicar la viruela, y en 1966 estableció una fecha límite para eliminarla totalmente: el año de 1976.

Si bien los programas de la OMS han sido particularmente efectivos y, como ya se indicó anteriormente, solo quedan unos - cuantos focos endémicos de la enfermedad en regiones conocidas, es necesario reconocer lo inconveniente de adoptar una posición excesivamente optimista en cuanto a la desaparición de la viruela a nivel mundial. En las condiciones actuales la diseminación del virus a partir de un foco endémico, por lejano que esté, es factible por el desarrollo de las comunicaciones internacionales. Parece más adecuado asumir una actitud cautelosa y no abandonar aún la vacunación ni la vigilancia epidemiológica. Esta manera de pensar es compartida por muchos expertos internacionales y una prueba de ello es que siguen apareciendo en la literatura especializada traba-

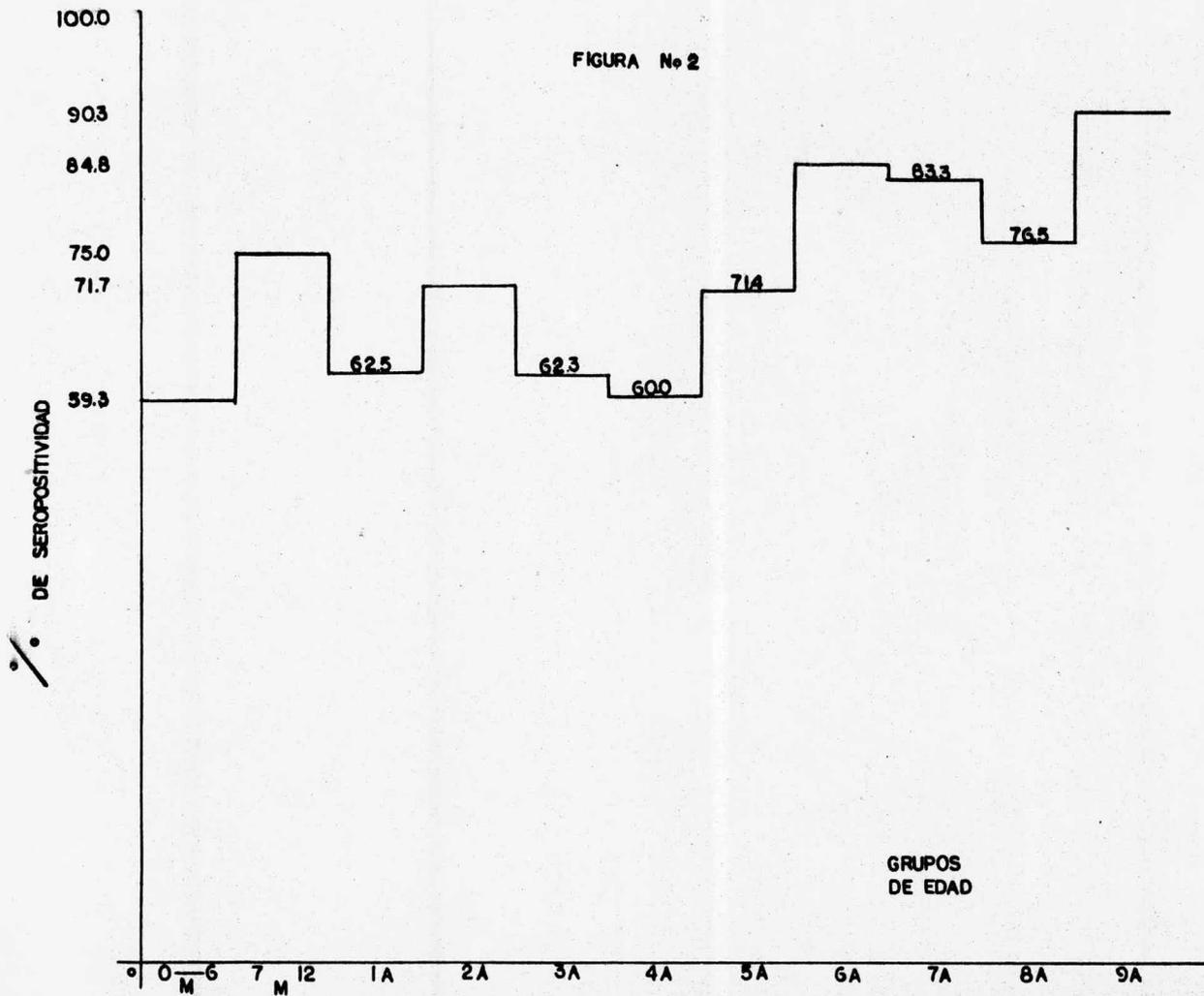
jos sobre nuevos tipos de vacunas antivariolosas (34, 35), sobre adelantos tecnológicos en relación a ciertas características de las vacunas en uso (por ejemplo, el efecto de la humedad residual en vacuna liofilizada y su estabilidad a diferentes temperaturas (42, 43) y sobre la respuesta antigénica a la vacuna antivariolosa combinada con otros agentes inmunizantes.

CUADRO N° 4

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DE VACCINIA.

E D A D	NEG.	1:4	1:16	1:64	1:256	TOTAL	%
0 - 6 meses	6	5	4	3	9	27	59.3
7 -12 meses	3	1	3	4	5	16	75.0
1 año	13	11	13	11	16	64	62.5
2 años	11	6	9	16	18	60	71.7
3 años	12	11	15	10	13	61	62.3
4 años	11	11	11	12	10	55	60.0
5 años	11	3	9	18	8	49	71.4
6 años	3	4	8	12	19	46	84.8
7 años	4	2	6	13	11	36	83.3
8 años	4	4	10	11	5	34	76.5
9 años	2	1	5	7	16	31	90.3
T o t a l	80	59	93	117	130	479	70.4

FIGURA No 2

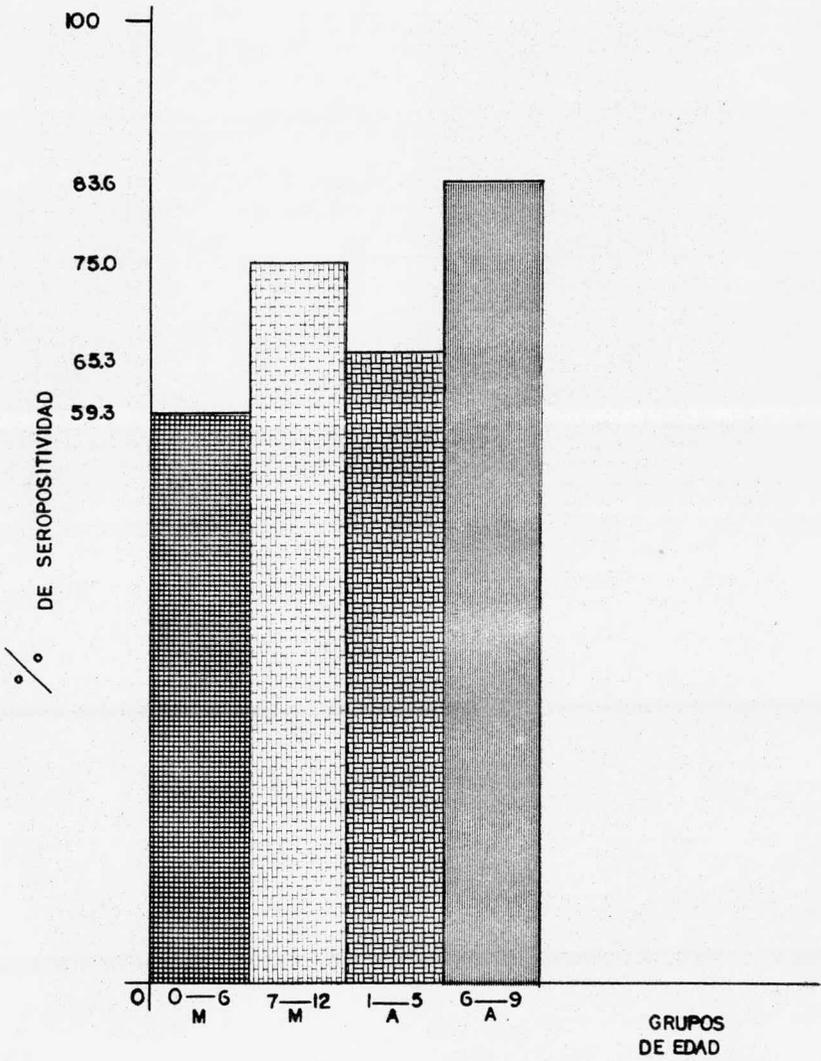


CUADRO N° 5

SEROPOSITIVIDAD EN DIFERENTES ETAPAS

E D A D	N° DE MUESTRAS	TOTAL	%
LACTANTES MENORES	16	27	59.3
LACTANTES MAYORES	12	16	75.0
PRE-ESCOLARES	189	289	65.3
ESCOLARES	123	147	83.6
T O T A L	340	479	70.4

FIGURA No 3



Las consideraciones anteriores establecen claramente la necesidad de definir en forma periódica las condiciones seroepidemiológicas prevaletentes. En nuestro país la viruela fue erradicada hace más de 20 años, por lo cual la vigilancia epidemiológica se ha reducido a el control sanitario de inmigrantes y de viajeros, estableciendo así una barrera a la introducción de virus, pero obviamente no hay datos de tipo epidemiológico que nos permitan conocer el estado inmunitario de la población. Por considerar que esto constituye una laguna importante en nuestros conocimientos sobre la situación seroepidemiológica de la viruela, se realizó esta encuesta de anticuerpos contra el virus de vaccinia en un grupo de niños representativo de la población infantil de la Ciudad de México, cuyos resultados se encuentran en los cuadros 4 y 5. En el cuadro 4 se presentan los resultados por grupos de edad y según los títulos de anticuerpos neutralizantes, y en el cuadro número 5 se muestran la proporción de seropositividad por etapas de la niñez. Los resultados de este trabajo indican una protección francamente alta sobre todo a nivel de escolares (83.6%), que incluye a los niños de 6 a 9 años de edad. Tal parecería que en los lactantes menores (0 a 6 meses de edad) una buena parte muestra títulos de anticuerpos compatibles con la presencia de anticuerpos heredados de la madre, y que el 40% de los mismos ya perdió esa protección y no ha sido vacunado todavía. En el grupo de lactantes mayores se aprecia un incremento de seropositividad que alcanza el 75%

si bien se trata de un grupo pequeño (16 casos) y la diferencia tal vez no sea significativa, también podría pensarse en que sea más frecuente la vacunación en lactantes mayores que en lactantes menores, lo cual es congruente con la recomendación oficial de aplicar la vacuna antivariolosa alrededor del año de edad. El hallazgo de un 65.3% de pre-escolares (1 a 5 años) seropositivos podría -- quizá interpretarse como consecuencia de una disminución en la actividad inmunizante a nivel individual, es decir, en niños que son llevados por la madre a un centro de vacunación, ya que en el -- último grupo (escolares de 6 a 9 años) se encontró un importante aumento en la prevalencia de seropositivos (83.6%), y es bien sabido que los programas de vacunación antivariolosa en las primarias ha sido sostenidos con razonable regularidad. Es de creerse que nuestros datos serológicos apoyan lo anterior.

De este estudio se desprende que la población objeto de la encuesta presenta un nivel de inmunidad contra la viruela relativamente alto (70.4% en total), cifra que no se esperaba de acuerdo a la información de Calderón y colaboradores (6); sin embargo cabe hacer notar que en dicho estudio los datos serológicos fueron obtenidos en muestras de adultos (14 a 45 años de edad), y que se utilizo el método de inhibición de la hemaglutinación. No puede descartarse la posibilidad de que una encuesta en adultos, utilizando el método de neutralización descrito en este trabajo arroje resultados similares a los de Calderón y colaboradores.

Para mayor objetividad en la presentación de nuestros resultados se prepararon los histogramas de frecuencia (Fig. 2 y 3) en los que se aprecia claramente las variaciones ya analizadas de los niveles de seropositividad.

A pesar de que la muestra estudiada presenta niveles de protección contra la viruela relativamente altos, y en tanto no transcurre algún tiempo (3 años?, 5 años?, 10 años?,) de erradicación completa de la enfermedad en todo el mundo, consideramos conveniente recomendar que no se interrumpa la vacunación antivariolosa por ahora y, de ser posible que se intensifique en los pre-escolares, ya sea que se trate de vacunación o de revacunación.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- 1).- Desde el punto de vista práctico, el método de neutralización en microplaca parece ser muy satisfactorio por su excelente reproducibilidad, por su sencillez técnica y por la economía considerable en tiempo, material de laboratorio y reactivos biológicos.
- 2).- La adaptación de los cultivos celulares a las condiciones adecuadas para la prueba no ofreció mayores dificultades.
- 3).- Los resultados indican niveles de protección francamente satisfactorios para los grupos de edad estudiados; queda la impresión de que se ha conservado una actividad importante en cuanto a vacunación antivariolosa en escolares y pre-escolares.
- 4).- Se cree necesario realizar una encuesta serológica en individuos de mayor edad, utilizando la misma metodología, a fin de tener un conocimiento más completo sobre el estado inmunario de la población general contra la viruela.
- 5).- Se considera conveniente recomendar que se continúe la aplicación de la vacuna antivariolosa por algunos años más, a pesar de que la enfermedad parece encontrarse muy cerca de la erradicación total.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Rhodes, A.J., Van Rooyen: *Textbook of Virology*. 5th. The -- Williams and Wilkins Co. Baltimore. 299, 1970.
- 2).- Horsfall, F.L., *Tamm I: Viral and Rickettsial Infections of -- Man*. 4 th. Edition. T.B.Lipincott, Philadelphia. 432, 1972.
- 3).- Espinoza, G.E.: *Programas y medidas de protección contra la viruela*. *Salud Pública Mexicana* 6: 831, 1964.
- 4).- Lennette, E.H., Schmidt N.J.: *Diagnostics Procedures for Viral and Rickettsial Infections*. 4a. Ed. American Public Health Association. New York. 283, 1969.
- 5).- *Morbidity and Mortality Weekly Report* 25: 32: 254, 1976.
- 6).- Calderón, E. Larios G., Vanzzini V., Heredia A., Gómez D., Genera y.: *Consideraciones apidemiológicas del virus de vaccinia utilizado en el control de la viruela*. Presentado en la XXVI Reunión de la Asociación de Investigación Pediátrica. Junio de 1968.
- 7).- Westwood, J.C.N., Harris W.J., Zwartouw H.T., Titmuss D.H. J., Appleyard G: *Studies on the structure of vaccinia virus*. *J. Gen. Microbiol.* 34: 677, 1964
- 8).- Gordon, M.H.: *Virus Bodies. Jhon Buist and the elementary -- bodies of vaccinia*. *Edinburgh M.J.* 44: 65, 1937.
- 9).- Torres, C.M.: *Further studies on the pathology of alastrim and their significance in the variola-alastrim problem*. *Proc Roy. Soc. Med.* 29: 1525, 1935.
- 10).- Smadel, J.E., Hoagland C.L.: *Elementary bodies of vaccinia*. *Bacteriol. Rev.* 6: 79, 1942.
- 11).- Zartouw H.T.: *The chemical composition of vaccinia virus*. *J. Gem. Microbiol.* 34: 115, 1964.
- 12).- Joklik, W.K.: *The purification of four strains of proxvirus*. *Virology.* 18: 9, 1962.

- 13).- Fenner, F.J., White D.O.: *Virología Médica*. Ed. la Prensa Médica Mexicana, México. 258, 265, 1973.
- 14).- Maitland, H.B., Maitland M.C.: Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* 2: 596, 1928.
- 15).- Baltazard, M., Boué A., Siadat H.: Etude du comportement du virus de la variole en cultures de tissus. *Ann. Inst. Pasteur* 94: 560, 1958.
- 16).- Vieuchange, J., De Brion G., Gruet J.: Virus variolique en cultures de cellules. *Ann. Inst. Pasteur* 95: 681, 1958.
- 17).- Marennikova, S. S., Gurvich E. B., Yumasheva M.A.: Laboratory diagnosis of smallpox and similar diseases by means of tissue culture methods. Sensitivity of tissue culture methods in the detection of variola virus. *Acta Virol.* 7: 124, 1963.
- 18).- Westwood, J.C.N., Zwartouw H.T., Appleyard G., Titmuss D,H. J.: Comparison of the soluble antigens and virus particle antigens of vaccinia virus. *J. Gen. Microbiol.* 38: 47, 1965
- 19).- Dumbell, K.R., Bedson H.S.: The use of ceiling temperature and reactivation in the isolation of poxvirus hyorids. *J. Hyg.* 62:133, 1964.
- 20).- Rondle, C.J.M., Dumbell K.R.: Antigens of cowpox virus *J. Hyg.* 60: 41, 1962.
- 21).- Downie, A.W.: Infection and immunity in smallpox. *The Lancet* 24: 419, 1951.
- 22).- Dixon, C.W.: *J. Hyg. Camb.* 46: 351, 1948.
- 23).- Rao, A.R., Prahlad I., Swaminathan M., Lakshmi A.: Pregnancy and smallpox. *J. Indian M. A.* 40: 353, 1963.
- 24).- Bancroft, I.R.: Clinical observations on variola. *J. Med. Res* 11: 322, 1904.
- 25).- Lynch, F.W.: Dermatologic conditions of the fetus with particular refernce to variola and vaccinia. *Arch. Derm. Syph.* 26: 997, 1932
- 26).- Dixon, C.W.: *Smallpox*. London Churchil. 512, 1962.

- 27).- Dixon, C. W.: Smallpox in Tripolitania an epidemiological and clinical study of 500 cases, including trials of penicillin treatment. *J. Hyg.* 46: 351, 1948
- 28).- Herrlich, A.: Variola. Eindrücke von einer. Epidemie in Bombay im Jahre. *Deutsch. Med. Wschr.* 83: 1426, 1958
- 29).- Jawetz, E., Melnick J. L., Adelberg E. A.: Manual de microbiología médica. 4a Ed. El Manual Moderno, S. A. México, 470, 1970
- 30).- Sweitzer, S. E., Ikeda K.: Variola; a clinical study of the -- Minneapolis epidemic de 1924-1925. *Arch. Derm. Syph.* 15: 19, 1927.
- 31).- Bras, G.: The morbid anatomy of smallpox. *Docum. Med. Geogr. Trop.* 4: 303, 1952.
- 32).- Bellanti, A.J.: *Inmunología*. 1a. Ed. Editorial Interamericana México, 265, 1972.
- 33).- *Morbidity and Mortality Weekly Report* 25: 9, 1976.
- 34).- Hekker, A.C., Johanna, Bos M., Smith L.: A stable freeze-dried smallpox vaccine made in monolayer cultures of primary rabbit kidney cell. *Journal of Biological Standardization.* 1: 21, 1973.
- 35).- Mettier, B., Haenzel Ingrid., Majer M.: Titration method for an ointment type smallpox vaccine in embryonated chicken eggs. -- *Journal of Biological Standardization.* 2: 65, 1974.
- 36).- Steinhardt, E., Israeli C., Lambert R. A.: Studies on the cultivation of the virus of vaccinia. *J. Infect. Dis.* 13: 294, 1913.
- 37).- Rivers, M., Ward S. M., Jennerian: Prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccinia virus. *J. Exp. Med.* 62: 549, 1935.
- 38).- Toolan, H.W.: Transplantable human neoplasms maintained in -- cortisone treated laboratory animals. *Cancer Res.* 14: 660, 1954.
- 39).- Morgan, J. F., Morton H. J., Parker R.C.: Nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium. -- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73: 1, 1950.

- 40).- Leibovitz, A.: The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *J. Hyg.* 78: 173, 1963.
- 41).- Karber, G.: Beitrag zur Kollektiven behandlung pharmakologischer rihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162: 480, 1931.
- 42).- Sparkes, J. D., Fenje P.: The effect of residual moisture in lyophilized smallpox vaccine on its stability at different temperatures. *Bull Wld Hlth Org.* 46: 729, 1972.
- 43).- Robinson, L. C.: A gas chromatographic method of measuring residual water in freeze-dried smallpox vaccine. *Bull Wld Hlth Org.* 47: 71, 1972.