

PURIFICACION Y DESECACION DE LA VACUNA
ANTIVARIOLICA LIBRE DE GERMENES
BACTERIANOS

A. M. VILCHES, E. CHIALVO

Las epidemias de alastrim, es decir una forma clínica de viruela, caracterizada por su escasísima mortalidad, se han sucedido en nuestro país en los últimos años; la dificultad en hacerlas desaparecer a pesar de una vacunación intensiva no se debe a diferencias antigénicas marcadas entre el virus vaccinal y el virus variólico local (experiencias de los autores), ni tampoco a un contenido escaso de virus en la vacuna, sino a defectos en la conservación de la vacuna.

Las soluciones para ese problema son sólo dos: a) conservar la vacuna a baja temperatura (preferentemente a -10°C) lo que resulta demasiado costoso para ser práctico; b) desecarla por un método seguro como la liofilización de Flosdorf y Mudd, es decir, congelarla y sublimar luego el hielo bajo vacío dejando sólo la sustancia seca.

La vacuna obtenida por infección vaccinal de embriones de pollo puede ser sometida directamente a la liofilización (1,2). Pero por razones no fácilmente explicables, los sanitaristas oponen aún cierta resistencia contra su empleo (3,4). Por ese motivo pareció más conveniente intentar la desecación de la linfa vaccinal de origen bovino; ésta contiene gran cantidad de bacterias y restos celulares que exigen una purificación previa.

Nuestros ensayos preliminares confirmaron la utilidad de la penicilina y la estreptomycinina para reducir el contenido bacteriano de la pulpa vaccinal, tal como han preconizado varios autores (7, 8, 9, 10); sin embargo, si se liofilizan las suspensiones así tratadas, el material desecado pierde rápidamente su título de virus al mantenerlo a 37°C , lo que fué interpretado por nosotros como debido a la presencia de cuerpos bacterianos muertos o de

restos celulares. En efecto, Amies (5) y Sordelli et al. (6) han demostrado que las suspensiones vaccinales purificadas por centrifugación diferencial mantienen su título mucho más perfectamente que los preparados que contienen elementos celulares; sin embargo este método de purificación es complicado y de escaso rendimiento.

Se decidió entonces intentar la purificación por un método físico simple que tiene como base el método de congelación y descongelación que se ha usado (12) para elaborar los antígenos de virus neurotrópicos para la fijación del complemento.

TECNICA DEL RECUESTO DE BACTERIAS. — Los recuentos fueron hechos (de acuerdo a la sugestión del Dr. Raúl Palacios) de la siguiente manera: el material fué suspendido al 1/10 en solución fisiológica y luego se hicieron diluciones de 10 en 10 en el mismo diluyente; 1 ml. de cada dilución se sembró en dos tubos de agar nutritivo blando (0.2 %) adicionado de 10 % de extracto de testículo. Las colonias fueron contadas después de 48 horas a 37° C. Se calculó el número de gérmenes viables determinando el "promedio ponderado" del número de colonias en las tres últimas diluciones que mostraron contaminación. Si el material a examinar contenía penicilina, se le agregaba previamente una cantidad de penicillinasa cinco veces superior a la necesaria para destruir la penicilina.

TECNICA DEL RECUESTO DE VIRUS. — Las diluciones del material se hicieron en la misma forma. Luego se inoculó 0.1 cc. de las diluciones sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollos de 11 días empleando seis embriones por dilución. Los embriones fueron llevados a una incubadora mantenida a 37° C.; 48 horas más tarde se extrajeron las membranas y se contó el número de lesiones. El cálculo del título infectante se realizó en la misma forma que para calcular el número de gérmenes.

EXPERIMENTO 1. — El material sometido a ensayo consistió en una suspensión al 20 % de pulpa vaccinal recogida de terneros que habían sido sometidos a infección vaccinal cinco días antes (*) y triturada en un "Waring blender" con solución fisiológica. Una parte de ese material fué centrifugada a 3000 r.p.m. durante 20 minutos

* Los autores agradecen al Dr. C. Harispe la colaboración prestada al facilitarles la pulpa vaccinal utilizada en estos estudios.

(porción B); otra fué congelada rápidamente con nieve carbónica y alcohol, conservada a -76°C . durante 24 horas, descongelada bajo un chorro de agua corriente y luego centrifugada a 2000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el abundante precipitado en copos (porción C); a una tercera porción se le agregaron 1000 U. de penicilina y 500 mcg de estreptomycinina por ml. y se incubó luego a 37°C durante 4 horas (porción D); finalmente otra parte del mismo material fué tratada con fenol al 0.5 % y dejada a 4°C . durante 24 horas (porción E).

Cada uno de los materiales así tratados fueron sometidos a un recuento de virus y de gérmenes; lo que sobró después de esas determinaciones fué desecado por el método líofilo (sublimación del agua contenida en el material previamente congelado) en ampollas que fueron luego cerradas a la llama con un vacío de 200 micrones de Hg. o menos. El cuadro N^o 1 demuestra los resultados obtenidos; el único de los métodos ensayados que permitió obtener un material desecado que conservaba alto título de virus después de 7 días a 37°C ., era el método C, con el que, además, se lograba una marcada reducción en el número de bacterias.

CUADRO N^o 1

Porción	Método	Sin desecar	Desecado y ensayado después de	
			7 días -15°C .	7 días 37°C .
A	Material original	Virus $10^{7.1}$ Gérm 82 millones	V. $10^{5.9}$	V. $< 10^1$ G. 59 millones
B	Sobrenadante después de centrifugado	Virus $10^{7.0}$ Gérm 315.000	V. $10^{5.7}$	V. $10^{2.1}$ G. 14.300
C	Sobrenadante después de congelado y descongelado	Virus $10^{7.2}$ Gérm 58.000	V. $10^{7.0}$	V. $10^{6.2}$ G. 2.400
D	Original + penicilina y estreptomycinina	Virus $10^{6.9}$ Gérm 310.000	V. $10^{6.0}$	V. $10^{2.9}$ G. 4.500
E	Original + fenol 0.5 %	Virus $10^{5.4}$ Gérm 12.000	V. $10^{4.2}$	V. $< 10^1$ G. 1.800

V = unidades infectantes de virus por ml.
G = número de gérmenes viables por ml.

EXPERIMENTO 2. — Fué realizado con el objeto de comparar el método de congelación y descongelación con otros basados en la precipitación de los materiales extraños (bacterias y restos celulares) a pH ácido, pero siempre más alto que el punto isoeléctrico del virus que es algo inferior a pH 4.7 (11).

La pulpa vaccinal suspendida al 20 % en solución fisiológica fué dividida en siete porciones, las que fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

A) Suspensión original sin tratamiento alguno.

B) Congelación a -76°C .; descongelación al cabo de 48 horas; centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos; desechar el sedimento.

C) Congelación, descongelación y centrifugación como en B; repetición del procedimiento con el sobrenadante.

D) Suspensión original más 3 % de una solución M/400 de ácido cítrico. Se produce un precipitado que se elimina por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante es neutralizado con Na_2CO_3 M/10. Este método es uno de los sugeridos por Behrens y Nielsen (11).

E) Procedimiento semejante a D: la adición de ácido cítrico se hace a una temperatura de 0°C . y en seguida se congela en nieve carbónica y alcohol; se descongela al cabo de 48 horas; se centrifuga y neutraliza con carbonato de sodio.

F) Este método es una variante de la precipitación en el punto isoeléctrico sugerida por Behrens y Nielsen; la linfa es enfriada a 0°C ., se agregan varios trocitos de nieve carbónica y se deja burbujear el anhídrido carbónico hasta que no quede más nieve. Se congela a -76°C . y se deja 48 horas a esa temperatura. Se descongela y centrifuga a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante (pH 4.9) es neutralizado con Na_2CO_3 M/10.

El cuadro número 2 demuestra una marcada reducción del número de bacterias por la aplicación de varios de esos métodos. El más eficiente parece ser la congelación y descongelación sobre todo si se la repite (C); este método tiene además la ventaja de estar sometido a menos

CUADRO N° 2

Tratamiento efectuado	Ensayo inmediato	Ensayo después de congelación -15° C. 20 días	Pérdida del volumen al final del tratamiento
A. Material original sin tratamiento (linfa $1/5$)	Gérmenes 280 millones	Virus $10^{6.8}$ Gérmenes 9.7 millones	0 %
B. Sobrenadante después de congelación y descongelación	Gérmenes 1.7 millones	Virus $10^{6.2}$ Gérmenes 75.000	21 %
C. Procedimiento B repetido 2 veces	Gérmenes 11.000	Virus $10^{5.9}$ Gérmenes 4.300	23 %
D. Precipitado con ácido cítrico. Sobrenadante	Gérmenes 8.2 millones	Virus $10^{6.3}$ Gérmenes 310.000	17 %
E. Id. a baja temperatura	Gérmenes 7.3 millones	Virus $10^{5.6}$ Gérmenes 41.000	13 %
F. Precipitado con nieve carbónica	Gérmenes 7.2 millones	Virus $10^{5.8}$ Gérmenes 50.000	19 %
G. Combinación de los métodos B y D.	Gérmenes 1.8 millones	Virus $10^{5.5}$ Gérmenes 82.000	21 %

variables que los de precipitación de las sustancias extrañas en el punto isoelectrico.

EXPERIMENTO 3. — La porción que había sido congelada dos veces fué sometida a la acción de un derivado de amonio cuaternario (Zephirol de la I. G. Farben, Zobenol de Winthrop) que es una mezcla de cloruros de alquildimetil- benzil-amonio (los radicales alkilo varían de C_8H_{17} a $C_{18}H_{37}$). Este antiséptico, que había ya sido usado por Kaiser (18) para la destrucción de las bacterias que acompañan a la linfa vaccinal, tiene la ventaja de su re-

ducido coeficiente térmico lo que le permite actuar a bajas temperaturas (0° a 4° C).

Se trató también de determinar si la adición de un posible protector del virus (suero de caballo) impedía de algún modo la acción antiséptica.

El material (con y sin suero de caballo al 15 %) fué mezclado con cantidades crecientes de Zobenol y llevado a la heladera de 4° C.; se tomaron muestras cada dos horas y se determinó el número de bacterias.

CUADRO N° 3

Lote	Con adición de suero de caballo				Sin adición de protector		
	Gérmenes				Gérmenes		
	2 hs	4 hs.	6 hs.	Virus a las 6 hs.	2 hs.	4 hs.	6 hs.
A. Suspensión de pulpa original. 2 congelaciones y descongelaciones 45 días de intervalo	5150	3980	2850	10 ^{5.99}	5150	4500	3980
B. Id. + Zobenol 1/5000	0	0	0	10 ^{5.61}	0	0	0
C. Id. + Zobenol 1/10.000	0	0	0	10 ^{5.72}	0	0	0
D. Id. + Zobenol 1/20.000	0	0	0	—	0	0	0
E. Id. + Zobenol 1/50.000	350	90	75	—	300	125	100
F. Id. + Zobenol 1/100.000	2100	1850	1230	—	1880	1900	950

El experimento fué realizado dos veces con resultados similares; el cuadro N° 3 resume uno de esos experimentos y muestra que el Zobenol en dilución de 1/20.000 elimina totalmente las bacterias después de dos horas y que una dilución de 1/10.000 (y hasta 1/5.000) no altera prácticamente el contenido en virus. Diluciones de 1/50.000 y mayores tienen un efecto sólo parcial en la eliminación de bacterias.

EXPERIMENTO 4. — Utilizando el mismo material que en el experimento anterior, al cual se agregó suero de caballo al 15 %, se trató de comprobar el efecto del Zobenol

en distintas diluciones, de la penicilina (1000 u. por ml.), de la estreptomycinina (500 mcg. por ml.) y de ambos antibióticos combinados, sobre el número de bacterias y sobre el contenido en virus. Las muestras tratadas con antibióticos fueron dejadas a 37° C. durante cuatro horas con el objeto de permitir a las bacterias su entrada en la fase de multiplicación activa.

Los resultados aparecen en el cuadro N^o 4 y concuerdan con los de un experimento semejante realizado posteriormente.

CUADRO 4

L O T E	Virus	Bacterias
Suspensión de pulpa original. 2 congelaciones con 45 días de intervalo. 2 horas a 4° C.	10 ^{6.76}	3375
Id. 4 horas a 37° C.	10 ^{6.68}	4575
Id. + penicilina 1000 u. 4 horas a 37° C.	—	29
Id. + penicilina 1000 u. + estreptomycinina 500 mcg. 4 horas a 37° C.	10 ^{6.84}	0
Id. + estreptomycinina 500 mcg. 4 horas a 37° C.	—	15
Id. + Zobenol 1/3000. 2 hs. a 4° C.	10 ^{5.72}	0
Id. + Zobenol 1/10.000. 2 hs. a 4° C.	10 ^{6.45}	0
Id. + Zobenol 1/30.000 2 hs. a 4° C.	—	35

Se puede observar que tanto el Zobenol 1/10.000 como la penicilina y estreptomycinina juntas eliminan totalmente las bacterias sin destruir el virus vaccinal en cantidad apreciable. La penicilina por sí sola y la estreptomycinina sola disminuyen mucho el número de bacterias sin lograr la esterilización.

EXPERIMENTO 5. — Este ensayo tuvo por objeto determinar cual de varios líquidos orgánicos era más apropiado para adicionar a las suspensiones purificadas de

pulpa vaccinal, como protector durante el proceso de la liofilización. Se probaron como posibles protectores las siguientes sustancias: suero de caballo, suero de bovino, yema de huevo, clara de huevo y leche descremada. Todas ellas fueron añadidas en la proporción del 25 %.

Los resultados (cuadro N° 5) demuestran que el virus es bien protegido por la clara de huevo y por el suero de bovino, algo menos por la yema de huevo y el suero de caballo y que la leche descremada es muy poco o nada protectora. El suero de bovino tiene la ventaja de provenir de los mismos animales que se usan para producir la vacuna, con lo que no se añaden a ésta nuevos factores que pudieran ser causa de alergia.

CUADRO 5

METODO		
	Gérmenes	Virus
A Suspensión original: 2 congelaciones y descongelaciones. Sin adición	< 10	< 10 ²
B Id. + suero de caballo 25 %	< 10	10 ^{3.55}
C Id. + yema de huevo 25 %	64.000	10 ^{3.81}
D Id. + clara de huevo 25 %	310.000	10 ^{5.05}
E Id. + leche descremada 25 %	< 10	< 10 ²
F Id. + suero de bovino 25 %	41.000 Virus 10 ^{5.0}	10 ^{5.0}

EXPERIMENTO 6.— En este experimento se intentó analizar las modificaciones en el contenido de virus y bacterias durante el proceso de las congelaciones y descongelaciones sucesivas. Una parte de la muestra inicial fué centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos y otra fué congelada a -76° C. durante 24 horas; esta segunda porción fué luego descongelada y centrifugada en la misma forma. El sobrenadante de esta última centrifugación fué dividido en ampollas y guardado a -15° C.; posteriormente, y a intervalos variables el contenido de esas ampo-

llas fué descongelado nuevamente y centrifugado a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos.

El cuadro N° 6 demuestra las alteraciones en el título de virus y el contenido de bacterias y la pérdida de volumen que ocurrió como consecuencia del tratamiento a que fueron sometidas las distintas muestras.

CUADRO N° 6

Método	Virus	Gérmenes	Volumen obtenido
Material original	10 7.77	48 millones	100 %
Centrifugación simple. Sobrenadante	10 7.2	170.000	80 %
1ª congelación (24 hs.) y descongelación. So brenadante.	10 6.95	37.000	78 %
2ª congelación y des- congelación. 3 días de intervalo. Sobrena- dante.	10 6.76	3.375	77 %
2ª congelación y descon- gelación. 4 días de in- tervalo. Sobrenadante	10 6.68	4.575	77 %
2ª congelación y descon- gelación. 7 días de in- tervalo. Sobrenadante	10 6.42	5.150	77 %
2ª congelación y descon- gelación. 10 días de in- tervalo. Sobrenadante	10 6.2	3.950	77 %
2ª congelación y descon- gelación. 27 días de in- tervalo. Sobrenadante	10 6.0	4.900	77 %

Se comprueba que el rendimiento en volumen es semejante por centrifugación simple y por el método de congelación y descongelación. En cuanto al contenido en gérmenes bacterianos el número de ellos se reduce a 3.500 ó 5.000 después de dos ciclos de congelación, a 37.000 después de un solo ciclo y a 170.000 por centrifugación simple.

El contenido en virus es poco afectado por cualquiera de los tres procedimientos, salvo cuando se deja un intervalo superior a cuatro días entre los dos ciclos de congelación y descongelación.

EXPERIMENTO 7. — Se tomó suspensión original al 20 % de pulpa vaccinal bovina y se analizó el contenido en virus y en gérmenes bacterianos en cada una de las etapas de purificación.

Este experimento (cuadro N° 7) demuestra que la congelación a -76° C. es más efectiva para la reducción del número de gérmenes que la congelación a -15° C. y que la segunda etapa de purificación es indispensable si se quiere eliminar totalmente las bacterias por el agregado posterior de Zobenol.

CUADRO N° 7

Método		Virus	Gérmenes	Gérmenes en el material tratado con Zobenol 1/10.000
A. Material original		$10^{7.22}$	102.000.000	—
B. 1ª etapa de purificación (48 hs. a -76° C)	Sobrenadante	$10^{6.99}$	1.350.000	190.000
	Sedimento	$10^{6.51}$	85.000.000	—
C. 1ª etapa de purificación (48 hs. a -15° C)	Sobrenadante	$10^{6.66}$	4.400.000	1.200.000
	Sedimento	—	102.000.000	—
D. 2ª etapa de purificación (Sobrenadante de B: 48 hs. a 76° C.)	Sedimento	$10^{6.72}$	6.500	0
	Sedimento	—	1.200.000	—

EXPERIMENTO 8. — Consistió en tomar una suspensión previamente purificada por dos etapas sucesivas de congelación y descongelación y añadirle luego sustancias pro-

tectoras y sustancias bactericidas, para tratar de determinar el tratamiento final. Esa suspensión se dividió en cuatro porciones a las que se agregó:

SPE—Suero de bovino 25 %	4 horas a 37° C.
Penicilina 1000 u. por ml.	
Estreptomicina 500 mcg. por ml.	
SZ—Suero de bovino 25 %	2 horas a 4° C.
Zobenol 1/10.000	
CPE—Clara de huevo 25 %	4 horas a 37° C.
Penicilina 1000 u. por ml.	
Estreptomicina 500 mcg. por ml.	
CZ—Clara de huevo 25 %	2 horas a 4° C.
Zobenol 1/10.000	

Después del tratamiento los materiales fueron liofilizados en porciones de 1 ml.

CUADRO 8

Lotes	Titulación inmediata		Titulación del virus después de conservar a 37° C.	
	Gérmenes	Virus	Durante 12 días Virus	Durante 42 días Virus
Material desecado				
SPE	0	10 6.55	10 5.14	10 5.09
SZ	0	10 6.50	10 5.94	10 5.35
CPE	0	10 6.71	10 5.96	10 4.97
CZ	0	10 6.67	10 5.79	10 4.76
Control (+) sin desecar y sin adiciones	4.200	10 6.40	—	—

(+) Suspensión de linfa al 20 % sometida a dos ciclos de congelación, descongelación y centrifugación.

El cuadro N° 8 muestra los resultados obtenidos, que si bien inicialmente fueron muy semejantes en todos los lotes, al cabo de 30 días a 37° C. eran más elevados en los lotes protegidos con suero de bovino.

EXPERIMENTO 9. — Con el objeto de asegurarnos que la capacidad infectante del virus vaccinal no había sido alterada con ese tratamiento, un lote de virus desecado (método SZ) fué utilizado para vacunar 24 niños vírgenes de infección vaccinal después de haber dejado las ampollas a temperatura ambiente durante dos meses. En el momento de usarla se abrió una ampolla y se disolvió su contenido en 0.7 ml. de agua destilada esterilizada, obteniéndose en pocos segundos una suspensión homogénea. El material así preparado era moderadamente viscoso, no contenía gérmenes bacterianos viables y su título de virus era $10^{5.92}$.

Todos los niños vacunados presentaron reacciones típicas de primovacunación, de moderada intensidad local y con escasos síntomas generales; las pústulas eran casi todas de borde dentado, lo que de acuerdo a la experiencia de Kaiser es señal de que la vacuna contenía más bien un exceso de virus.

D I S C U S I Ó N

Son muchos los autores que han descripto la preparación de vacunas desecadas sin someterlas a ningún tratamiento previo o añadiendo solamente penicilina, pero ninguno de ellos describe la potencia y el grado de contaminación del material original y del producto obtenido finalmente e incluso, por no usar penicilinasa en los recuentos de gérmenes (13), han merecido la crítica de Sanijiva Rao (14).

Los métodos por adsorción y elución (15,16), por filtración o por varios ciclos de centrifugación diferencial no resultan prácticos para la purificación de las suspensiones de pulpa vaccinal, pues se produce una pérdida considerable de virus en el transcurso de esas maniobras. Los disolventes de las grasas dan resultados muy irregulares (6) y aún hay autores (17) que los consideran totalmente inapropiados para la purificación de la vacuna.

Ya Kaiser en 1937 (18) señaló que en las linfas conservadas a -14° C. durante varios meses los gérmenes disminuyen en número. Pero aún hay más; si ese material se descongela y centrifuga ocurre un fenómeno semejante al que se observa sometiendo al mismo tratamiento suspensiones de tejido nervioso: se produce un precipitado en copos que arrastra consigo gran parte de las bacterias

contenidas en la suspensión. Los experimentos arriba descritos demuestran que el sedimento así precipitado contiene gran parte de los componentes causantes de la inestabilidad del material desecado; si se razona por analogía con lo que ocurre en las suspensiones de sistema nervioso central o en el plasma humano es probable que esos componentes sean lipoproteínas (19,20) (éstas generalmente se desnaturalizan y precipitan por congelación y descongelación) que hacen difícil lograr un material perfectamente desecado; otro posible factor es la presencia de factores enzimáticos de los tejidos y bacterias con capacidad para destruir activamente el virus.

La suspensión así obtenida por un método simple reúne varias condiciones deseables en una linfa vaccinal; es homogénea, sin grumos, con lo que se obtienen resultados más regulares en la administración; carece de gérmenes; se han eliminado los restos celulares que no contribuyen en nada a la eficacia de la vacuna y que le restan estabilidad frente a los cambios ambientales; se puede titular con resultados cuantitativos muy regulares en el embrión de pollo lo que no ocurre siempre con la linfa glicerinada.

No se han realizado pruebas para determinar como se modifica con el tiempo la actividad del material después de su rehidratación. Es probable, sin embargo, que la potencia se destruya rápidamente por lo que no se aconseja usarlas después de más de un día en la heladera de 4° C. Convendrá estudiar la posibilidad de usar glicerina bufferizada al 50 % como diluyente con el objeto de hacer más duradera la vacuna rehidratada.

R E S U M E N

Se describe un método para la purificación y desecación de la vacuna antivariólica el que consiste esencialmente en las siguientes etapas:

1. — Congelación a -76° C. de una suspensión al 20 % de pulpa vaccinal triturada en solución fisiológica.

Después de 24 o 48 horas:

2. — Descongelación y centrifugación a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos.

3. — Congelación del sobrenadante a -76° C.

4. — Después de 24 ó 48 horas, repetición de la etapa 2.

5. — Añadido de penicilina (1.000 u. por ml.) y de estreptomycin (500 mcg. por ml.); dejar 4 horas a 37° C. Pueden ser reemplazadas por Zobanol 1/10.000 (dos horas a 4° C.).

6. — Añadido de un coloide protector que puede ser suero de bovino (preferiblemente) o clara de huevo en una concentración del 25 %.

7. — Fraccionamiento en cantidades de 1 ml. y desecación al vacío por el método liófilo de Flossdorf y Mudd.

BIBLIOGRAFIA

- 1) HOFFSTADT, R. E., TRIPI, H. B. — "A study of the survival of certain strains of viruses after lyophilization and prolonged storage". J. Inf. Dis., 73: 133, 1946.
- 2) NAGLER, F. P. O. — "Red cell agglutination by vaccinia virus. Application to a comparative study of vaccination with egg vaccine and standard calf lymph". Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc., 22: 29, 1944.
- 3) ELLIS, R. V., BOYNTON, R. E. — "Smallpox vaccination. A comparison of vaccines and techniques". Pub. Health Rep., 54: 1012, 1939.
- 4) DONALLY, H. H. — "Smallpox vaccination of infants". J. A. M. A., 113: 1796, 1939.
- 5) AMIES, C. R. — "The influence of temperature on the survival of pure suspensions of the elementary bodies of vaccinia". Brit. J. Exp. Path., 15: 180, 1934.
- 6) SORDELLI, A., FERRARI, J., GVIRTZMANN I. — "Investigaciones acerca de la purificación y estabilización de la vacuna antivariólica". Rev. Inst. Bact. (D. N. H.), 9: 542, 1940.
- 7) RIVAROLA, J. B. — "La penicilina en la purificación de la pulpa vaccinal". Rev. Brasil Biol., 4: 483, 1944.
- 8) DÍAZ ROMERO, L. — "La penicilina en la purificación de la vacuna antivariólica". Arch. Soc. Bio. Montev., 12, 151, 1945.
- 9) MORÍN, E., TURCOTTE, H. — "Purification biologique de la lymphé vaccinale par la penicilline". Ann. Inst. Pasteur, 73: 591, 1947.
- 10) KRISHNAMURTHY, V. N. — "Effects of penicillin and streptomycin on vaccine lymph (calf-lymp)". Nature, 165, 451, 1950.
- 11) BEHRENS, C. A., NIELSEN, F. A. — "Purification of the virus of vaccinia (isoelectric point method)". J. Inf. Dis., 56: 41, 1935.
- 12) CASALS, J., PALACIOS, R. — "The complement fixation test in the diagnosis of virus infections of the central nervous system". J. Exp. Med., 74: 409, 1941.
- 13) GOHAR, M. A., BASHATH, A. — "The effect of penicillin on the vaccinia virus". J. Trop. Med. Hyg., 49: 115, 1946.
- 14) RAO, R. S. — "Purification of vaccine lymph by penicillin". Ind. J. Med. Res., 37: 267, 1949.

- 15) KLIGLER, J. J. — "*Protein-free suspensions of virus. IV. Purification of vaccine virus by adsorption and elution.*" Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 32: 222, 1934.
- 16) YAOI, H. — "*On the subcutaneous vaccination by means of purified vaccine virus.*" Jap. J. Exp. Med., 14: 311, 1936.
- 17) DEARING, W. P. — "*The effects on vaccinia virus of certain lipoids solvents.*" Am. J. Hyg., 20: 432, 1934.
- 18) KAISER, M. — "*Zur Foage der Herstellung eines bakterienfreien Trockenimpfstoffes gegen Pocken.*" Zbl. f. Bakt., 139: 405, 1937.
- 19) SURGENOR, D. M. — Comunicación personal.