

Embriones de pollo sobrevivientes a la inoculación de una cepa de virus de la encefalomielitis equina ⁽¹⁾

POR LOS DOCTORES

JOSE JULIO MONTEVERDE (*) Y DOMINGO HECTOR SIMEONE (**)

Higbie y Howitt ⁽⁴⁾ demostraron el rápido efecto letal y la considerable multiplicación del virus de la encefalomielitis equina en el embrión de pollo, conclusiones que fueron confirmadas por varios investigadores ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾, ⁽⁶⁾.

Bang ⁽¹⁾ aplicando el método de Reed y Muench ⁽¹¹⁾ en embriones de pollo de 10 días de edad encuentra que paralelamente con el aumento de ésta, el virus de la encefalomielitis equina disminuye su capacidad agresora. Al tratar de explicar estos hechos los relaciona con un aumento progresivo en la resistencia de la membrana corioalantoides.

En la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos que presenten objeciones tendientes a disminuir el concepto de la exquisita susceptibilidad del embrión de pollo a la inoculación del virus de la encefalomielitis equina, y en cambio se repiten las recomendaciones de su empleo para diversos propósitos ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾, ⁽⁶⁾, ⁽¹⁹⁾.

En experiencias preliminares inéditas, que más adelante se exponen, observamos la supervivencia de algunos embriones de pollo después de haberlos inoculado con dosis elevadas de virus activo de la encefalomielitis equina. En el presente trabajo se agregan otras investigaciones con el objeto de repetir la presentación del fenómeno señalado, teniendo en cuenta, al planear los experimentos, la edad de los embriones de pollo y el cálculo de las dosis empleadas según la técnica de Reed y Muench.

(1) Entregado para su publicación julio de 1947.

(*) Profesor Adjunto y Jefe de Trabajos Prácticos de Bacteriología.

(**) Adscripto y Ayudante de la Cátedra de Bacteriología.

PARTE EXPERIMENTAL

Durante la realización de tareas rutinarias destinadas a preparar en gran escala vacuna a embrión de pollo para encefalomiелitis equina, se pudo observar, sobre 400 embriones de pollo de 10 a 11 días de edad inoculados con 0,05 ml de suspensión al 20 % de tejido cerebral virulento de cobayo, la supervivencia de 60 embriones que continuaron su ulterior desarrollo embrionario sin inconvenientes, a juzgar por el control ovoscópico. Posteriormente y con el objeto de evitar la presentación del fenómeno aludido, que representaba desde el punto de vista práctico una interferencia nada despreciable, se adoptaron una serie de precauciones destinadas a la obtención de las cifras máximas de mortalidad, fué así que en otras experiencias se emplearon cuatrocientos embriones de pollo de 10 a 11 días de edad los que con la misma cepa de virus fueron inoculados a la dosis de 0,1 ml de una suspensión al 30 % de cerebro virulento de cobayo, extraído de animales en el período agónico de la infección encefalomiелítica experimental. En esta segunda prueba se repitió el fenómeno y alrededor del 10 % de los inoculados se comportaron, aparentemente, como animales refractarios, dando lugar al nacimiento de pollos bien conformados.

En otras seis experiencias parciales en donde se empleó ún total de 2000 embriones de pollo de 9 a 12 días de edad, se pudo apreciar nuevamente, que si las condiciones del experimento no variaban, en todos los casos se presentaban embriones de pollo, seguramente inoculados, que no aparecían afectados en su vitalidad después de recibir descargas extraordinarias de virus activo.

Las experiencias que motivan el presente trabajo se han desarrollado en la forma que sigue:

1) MATERIAL Y METODOS

Virus: Se ha utilizado una cepa de virus encefalomiелitis equina tipo Oeste que inoculada en dilución 10^{-1} por vía intralingual al cobayo de 250-300 g de peso vivo, le ocasiona la muerte en $4\frac{1}{2}$ -5 días precedida de la sintomatología característica de la infección experimental. El virus ha sido conservado por sucesivos pasajes en cobayos, siempre por la vía intralingual, operación que se cumplió aproximadamente cada 30 días, durante un período de tiempo calculado en 6 años. Cerebros extraídos de cobayos en período agónico, debido a la infección experimental, fueron conservados en solución glicerinaada al 33 % a temperatura de $+4^{\circ}$ - 5° C.

Suspensiones de virus: Estérilmente se pasó una porción de tejido cerebral de 6 días como máximo de conservación, que se trituró en mortero estéril, efectuando una suspensión al 10 % por agregado de solución «buffer» de pH 7,2. Con el objeto de eliminar restos tisulares se centrifugó durante 10 minutos a 2000 r. p. m. El líquido sobrenadante fué extraído estérilmente, efectuando controles de esterilidad y conservándolo a $+4^{\circ}$ - 5° C para utilizarlo hasta dentro de los 8 días de preparado. A partir del sobrenadante libre de infección bacteriana se efectuaron las diluciones necesarias.

Embriones: Los embriones utilizados fueron suministrados por el Parque Avícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (***) , originados en huevos recogidos en los planteles generales que se hallaban en buen estado sanitario. Las entregas se efectuaron en el período de tiempo comprendido entre fin de verano y principio de otoño. Los embriones fueron recibidos en el laboratorio 24 horas antes de iniciar las experiencias; después de este tiempo, por control ovoscópico se eliminaron todos aquellos que presentaron anomalías en su vitalidad, utilizando por lo tanto un lote homogéneo.

Inoculación: Con alcohol iodado se desinfectó la cáscara de cada huevo embriionado en la zona a perforar y sus adyacencias. Con ayuda del ovoscopio se eligió un punto inmediatamente posterior a la base de la cámara de aire (aproximadamente 1-2 mm) en donde no se visualizaban vasos sanguíneos y con instrumento apropiado se efectuó una pequeña perforación para dar paso a la aguja. Con jeringa graduada (tipo tuberculina) previamente esterilizada y conteniendo la suspensión de virus elegida se penetró por el orificio efectuado en la cáscara con dirección oblicua (aproximadamente 1 cm) de atrás hacia adelante y 1 cm de arriba a abajo, es decir intraalantoides. El orificio de penetración fué obturado con parafina fundida y los embriones así inoculados fueron rápidamente colcados en la incubadora del laboratorio, mezclándolos con embriones sin inocular, que actuaron como controles. Con termómetro de máxima y mínima se efectuó el registro térmico diario de la incubadora ($38,7^{\circ}$ C- $39,3^{\circ}$ C) ejerciendo también vigilancia sobre el grado de humedad.

Observación de los embriones inoculados: Después de transcurridas 20-30 horas de la inoculación, todos los embriones, incluso los controles sin inocular, fueron observados al ovoscopio. Se retiraron los que no presentaban manifestaciones de vida y los sobrevivientes, previo volteo, fueron incubados nuevamente y vueltos a observar cada 18-24 horas. Todo embrión muerto después de inoculado, fué extraído del huevo con las precauciones asépticas del caso, depositado en mortero estéril y triturado con agregado de arena estéril. Posteriormente volcando solución «buffer» en el triturado, se efectuó una dilución aproximada al 50 %, que luego de rápida centrifugación (10 minutos a 2.000 r. p. m.) fué inoculada por la ruta intracerebral a cobayos de 350-450 gr de peso a razón de 0,05 ml y a lauchas de 18-22 gr a razón de 0,01 ml. Estos roedores eran vírgenes de la infección encefalomielítica.

(***) El Ing. Agr. Roberto P. Peirano, Jefe del Parque Avícola, vigiló las operaciones correspondientes, colaboración que agradecen los autores.

Sobrevivientes: Se consideró sobreviviente todo embrión que después de 96 horas de inoculado presentaba a la observación ovoscópica signos claros de vitalidad comparada siempre con los embriones testigos sin inocular de igual edad.

Controles: Se efectuaron controles con suspensiones de triturados de cerebro de cobayo sano preparadas con igual técnica que la señalada para el caso de cerebros virulentos que fueron inoculados a igual concentración y dosis, a embriones de distintas edades. En igual forma se controló la solución «buffer» empleada y la posible intervención del trauma operatorio.

A) RESULTADOS

En los cuadros N° 1 y N° 2 que siguen se resumen los resultados obtenidos en el cálculo de la dosis letal 50 (DL 50) para cobayos y lauchas según las recomendaciones de Reed y Muench (¹¹). En las pruebas efectuadas se emplearon cobayos de 300-350 gramos de peso y lauchas de 20-25 días de edad, los primeros fueron inoculados por la vía intralingual y éstas por la ruta intraperitoneal.

CUADRO 1. — Cálculo DL50 para cobayos (intralingual)

Dilución	Muertos	Sobre- vivos	Total		Mortalidad
			Muertos	Sobre- vivos	
10 ⁻¹	6	0	18	0	100 %
10 ⁻²	6	0	12	0	100 »
10 ⁻³	4	2	6	2	75 »
10 ⁻⁴	2	4	2	6	25 »
10 ⁻⁵	0	6	0	12	0 »

CUADRO 2. — Cálculo DL50 para lauchas (intraperitoneal)

Dilución	Muertos	Sobre- vivos	Total		Mortalidad
			Muertos	Sobre- vivos	
10 ⁻¹	4	0	8	0	100 %
10 ⁻²	3	1	4	1	80 »
10 ⁻³	1	3	1	4	20 »
10 ⁻⁴	0	4	0	8	0 »
10 ⁻⁵	0	4	0	12	0 »

En los cuadros N° 3 y N° 4 se consignan los resultados que se refieren a la supervivencia y mortalidad debidas a la inoculación de embriones de pollo desde 7 hasta 13 días de edad con 0,1 ml de dilución 10^{-1} de la cepa en estudio que representa 500 DL 50 para cobayo por la ruta intralingual.

EMBRIONES DE POLLO DE DIFERENTE EDAD INOCULADOS CON 0,1 ML DE DILUCIÓN 10^{-1} DEL VIRUS EN ESTUDIO

CUADRO 3

Edad en días	Inoculados	Muertos	Sobrevivientes
7	5	5	0
8	5	5	0
9	5	3	2
10	6	4	2
11	6	5	1
12	8	7	1
13	8	8	0
Totales	43	37	6

CUADRO 4

Edad en días	Inoculados	Muertos	Sobrevivientes
7	5	5	0
8	5	5	0
9	5	5	0
10	6	6	0
11	6	5	1
12	8	8	0
13	8	4	4
Totales	43	38	5

En los ensayos que se resumen a continuación en los cuadros N° 5 y N° 6 se empleó un número mayor de animales tratando siempre de relacionar la presentación de sobrevidas con la edad. En esta oportunidad se utilizaron embriones desde 7 hasta 17 días de edad. La dosis inoculada fué 0,1 ml de dilución 10^{-1} del virus en estudio.

CUADRO 5

Edad en días	Inoculados	Muertos	Sobrevivientes
7	4	4	0
8	4	4	0
9	4	4	0
10	4	4	0
11	4	4	0
12	4	2	2
13	4	4	0
14	4	1	3
15	4	3	1
16	4	1	3
Totales	40	31	9

CUADRO 6

Edad en días	Inoculados	Muertos	Sobrevivientes
7	4	4	0
8	4	4	0
9	4	4	0
10	4	4	0
11	4	4	0
12	4	3	1
13	4	4	0
14	4	3	1
15	4	4	0
16	4	4	0
Totales	40	38	2

El cómputo general que se refiere a los ensayos correspondientes a los cuadros N° 3, N° 4, N° 5 y N° 6 es el siguiente:

Edad del embrión en días	N° de inoculados con $0,1 \text{ ml } 10^{-1}$	Muertos	Vivos	% Mortalidad
7	18	18	0	100
8	18	18	0	100
9	18	16	2	88,8
10	20	18	2	90
11	20	18	2	90
12	24	20	4	83,3
13	24	20	4	83,3
14	8	4	4	50
15	8	7	1	87,5
16	8	5	3	37,5

Los cálculos que se refieren al por ciento de mortalidad con respecto a la edad, quedan sujetos a nuevas comprobaciones empleando en cada caso un número mayor de embriones de pollo, especialmente en lo que se refiere a embriones de 14, 15 y 16 días de edad. De todas maneras surge con claridad que después del 8° día no se obtienen las cifras de letalidad máxima.

CONSIDERACIONES

La comprobación de que embriones de pollo, sin tratamiento previo, no sucumben a la acción de una considerable dosis de virus de la encefalomiélitis equina, merece ser considerada en algunos detalles de técnica, dado que de no ser debidamente aclarados podrían dar lugar a su relación con la producción del fenómeno.

En este sentido deben tratarse algunas situaciones que podrían ser motivo de discusión. Una de ellas se refiere a la posibilidad de que la dosis de virus no se haya puesto en contacto con los tejidos embrionarios, lo que se excluye, pues la técnica empleada fué cuidadosamente controlada en este aspecto y aún se evitó la posible salida de parte de la misma ya que una vez efectuada la descarga el orificio de penetración se obtuvo rápidamente con parafina fundida, cierre que se comprobó inalterado en las sucesivas observaciones ovoscópicas.

Otro punto a tratar es si el virus que llegó al embrión mantenía su habitual actividad. En este sentido se debe considerar que las interfe-

rencias debidas a la acción de agentes químicos o físicos deben descartarse; pues las suspensiones de virus no tuvieron contacto con el calor ni con los antisépticos. Se podría objetar una posible pérdida de poder agresor por envejecimiento de las diluciones durante su breve período de conservación, lo que no queda confirmado al apreciar muertes en embriones inoculados con el mismo volumen cargado en la jeringa y también debido a que la suspensión empleada aún después de 17 días de conservación a $+4^{\circ}\text{C}$ se mostró, a la dosis usada, mortal para embriones de 7 días de edad.

Por lo que se refiere a la presentación de embriones sobrevivientes en las condiciones ya expresadas, se insiste que esto no constituye una mera curiosidad o un fenómeno transitorio u ocasional, ya que el mismo se ha comprobado en todos los ensayos realizados, eso sí en porcentajes relativamente bajos y siempre al trabajar con gran número de embriones. La cifra de cerca de 3000 embriones de pollo controlados en distintos años se ha juzgado razonable, debido a que elimina la duda acerca de que las observaciones hayan sido efectuadas con apresuramiento o limitaciones.

Se hace resaltar que la supervivencia de embriones de pollo se comprueba en las condiciones de esta experiencia con la cepa de virus mantenida sobre cobayo. El simple pasaje por embrión de pollo induce un aumento en la capacidad agresora de la cepa de virus en estudio y en estas condiciones los embriones sucumben a la inoculación subcorioalantoides entre los 7 y 16 días de edad.

Ha sido también motivo de atención el considerar la potencia de la dosis utilizada en los ensayos protocolizados en el presente trabajo, ya que en los no protocolizados la dosis empleada tenía mayor concentración de virus. La dilución 10^{-1} a razón de 0,1 ml inoculada a cada embrión de pollo ha inducido aproximadamente el 90 % de muertes en el conjunto de animales inoculados; por otra parte la dosis empleada transportaba bastante virus activo ya que la dosis letal 50 para cobayos, vía intralingual, fué calculada en $10^{-3.5}$ y para lauchas por la vía intraperitoneal en $10^{-2.5}$. Los resultados obtenidos permiten expresar que los embriones de pollo fueron inoculados en cada caso con 50 dosis L 50 para cobayos y 50 dosis L 50 para lauchas, es decir regularmente mortales para estos roedores. La comprobación de que algunos embriones resistieron sin morir esta apreciable descarga de virus, autoriza a inferir que para este caso y en las condiciones de las presentes experiencias los mismos son menos susceptibles que cobayos y lauchas a diluciones relativamente concentradas de virus de la encefal-

lomielitis equina, situación que no está de acuerdo con algunas experiencias de Higbie y Howitt (4) en donde se registra que una cepa de virus de la encefalomielitis equina que mata al cobayo hasta la dilución $10^{-4.5}$, también lo hace con el embrión de pollo hasta la dilución 10^{-6} y se afirma posteriormente que las inoculaciones en cobayos con respecto al embrión de pollo presentan un curso con frecuencia paralelo aunque éste es más sensible a las altas diluciones de virus que el roedor.

Cuando se analizan los protocolos del texto se observa que si la edad de los embriones de pollo no sobrepasa a los 8 días, éstos resultan regularmente susceptibles a la acción letal del virus a la dosis empleada, lo que constituye otra demostración de la actividad del mismo. Esta apreciación conduce a relacionar la supervivencia de los embriones de pollo inoculados con la edad y en esto también se presenta en parte, alguna vinculación con otras experiencias (7), (8), (14), (15), en donde se demuestra que la capacidad invasora del sistema nervioso central por el virus de la encefalomielitis equina se halla condicionada a la edad y ruta de penetración del agente infeccioso. También se han estimado interesantes los hallazgos de Bang (1) que descubre que una cepa de virus de la encefalomielitis equina tipo Este cumple el punto final 50 % de muertes a dilución algo menor que $10^{-8.5}$ tratándose de embriones de pollo de 10 días de edad y en cambio el mismo punto resulta algo menor que $10^{-7.5}$ en correspondencia con embriones de 16 días cumplidos. Los estudios efectuados con una cepa tipo Oeste causó menores diferencias ya que el punto final 50 % de muertes para embriones de 10 días de edad estuvo ligeramente por arriba de $10^{-7.5}$ y alrededor de 10^{-7} para embriones de 16 días cumplidos.

Si bien es cierto que Bang encuentra las diferencias aludidas con respecto a la edad del embrión, no considera embriones sobrevivientes en el concepto aquí sostenido, ya que sus cálculos se basan sobre la dosis letal 50 en embriones de pollo y aun considera que si la inoculación del virus, de pasaje por embrión de pollo, se efectúa antes de la eclosión, puede producirse el nacimiento, pero seguido de la muerte del pollo a consecuencia de la actividad del virus, lo que trae tácitamente aceptada la susceptibilidad del embrión de pollo hasta el final de la incubación.

Como en estos ensayos las sobrevividas de embriones de pollo inoculados con 500 dosis L50 para cobayo, se han presentado en los mayores de 8 días, se puede sostener que para las dosis de virus empleadas los embriones de pollo difieren en la susceptibilidad al

éxito letal durante la etapa embrionaria comprendida entre los 7 y 16 días.

Puede resultar de interés referir que se ha comprobado que el virus de la encefalomiелitis tipo *Este* produce la muerte de aves ⁽¹⁶⁾, ⁽¹⁷⁾, ⁽¹⁸⁾ y que Levine y Graham ⁽⁵⁾ demostraron que algunos pollos de 15 y 21 días de edad resistían la inoculación intracerebral de 0,1 ml de una dilución 10^{-7} de virus de la encefalomiелitis equina tipo *Oeste* y debido a esta circunstancia afirmaron que este hecho constituía un importante contraste si se lo comparaba con la reconocida sensibilidad de los embriones de pollo a la infección mortal por este virus.

Otra situación que puede presentar valor en la posible explicación de estos fenómenos es la que se encuentra vinculada a la procedencia de la cepa de virus empleada y especialmente al mecanismo seguido en la conservación «in vivo» hasta el momento de iniciar las experiencias.

Traub y Ten Broeck ⁽¹³⁾ utilizando una cepa de virus de la encefalomiелitis equina mantenida durante varias generaciones por pasajes en palomas y corderos, señalan la inducción de importantes modificaciones en su calidad agresora ya que inoculada subcutáneamente y en dosis suficiente en 9 equinos, ninguno presentó sintomatología y en cambio 4 de ellos desarrollaron un buen grado de inmunidad.

En las experiencias que motivan esta publicación se ha empleado una cepa de virus mantenida en cobayo por la ruta intralingual por alrededor de 70 pasajes efectuados aproximadamente cada 30 días. Se consigna este hecho dado que el terreno biológico y la ruta de penetración pueden haber influido en las características del mismo. Refuerza en parte esta suposición la comprobación de Pires y col. ⁽¹⁰⁾, quienes utilizando virus de la encefalomiелitis equina tipo *Oeste*, mantenido exclusivamente por la ruta intracerebral en cobayos, obtienen las cifras máximas de letalidad para embriones de pollo de 9 días de edad inoculados a razón de 0,01 ml de suspensión al 1 % de cerebro infectado de cobayo.

La relación entre actividad de algunas cepas de virus tipo *Oeste* para embriones de pollo mantenidas por ruta intracerebral y extracerebral se presenta así constituyendo motivo de nuevas investigaciones.

No se descuida en la explicación de estos fenómenos, compartiendo la opinión de Da Graña ^(*) ^(**), la posible ingerencia de los factores de ra-

(*) Comunicación personal.

(**) Profesor titular de Clínica Médica y Quirúrgica de Animales Pequeños. Fac. Agr. y Vet. Univ. Buenos Aires.

za y hereditarios en los que atañe al embrión de pollo. Se hace constatar que no parece desacertado meditar acerca de que los embriones de pollo sobrevivientes a la infección vírica puedan asimilarse, en cierto modo, a reservorios de virus activo o modificado ya que para otras especies, la supervivencia de virus neurotrópicos se ha demostrado en ausencia de sintomatología clínica ⁽⁹⁾, ⁽¹²⁾, ⁽²⁰⁾, ⁽²¹⁾. No se olvida que estos hechos pueden estar conectados al fenómeno de interferencia.

Quedan para futuras investigaciones el considerar las reacciones originadas en los embriones de pollo que han soportado con vida una descarga de virus que habitualmente resulta regularmente mortal; los probables cambios ocurridos a esta cepa de virus en su sistema agresor y los factores implicados que permitan reproducir con regularidad las sobrevidas en embriones de pollos sin tratamiento previo inoculados con un virus activo de la encefalomyelitis equina.

CONCLUSIONES

1ª — No se ha comprobado constante efecto mortal en embriones de pollo mayores de 8 días de edad, inoculados con una dosis de virus de la encefalomyelitis equina, calculada en 500 DL₅₀ para cobayo.

2ª — En igualdad de condiciones los embriones de pollo menores de 9 días de edad, sucumben regularmente por la acción del virus.

RESUMEN

En el presente trabajo se dan a conocer algunos resultados obtenidos en la inoculación de varios centenares de embriones de pollo, con una cepa de virus de la encefalomyelitis equina. Se ha podido comprobar que, en las condiciones de esta experiencia, no mueren todos los embriones de pollo inoculados con una dosis considerable de virus activo calculada en 500 DL₅₀ para cobayos por vía intralingual, la que ha resultado regularmente mortal al emplear embriones de pollo menores de 9 días de edad.

Los embriones de pollo que después de recibir una dosis de la cepa de virus en estudio soportaron con vida la agresión vírica, a la que sucumben regularmente cobayos y lauchas vírgenes de la infección, constituyen un excelente material de investigaciones futuras.

SUMMARY

This work is a report on a number of results obtained with a strain of equine encephalomyelitis virus with which several hundreds

of chick embryos were inoculated. It was found that the inoculation of a considerable dose of active virus (i. e. 500 DL₅₀ as figures out for guinea pigs inoculated by intralingual way) does not cause the death of all chick embryos under conditions similar to those of said experiment; such dose, however, appears to be a deadly one for all chick embryos being less than nine days old.

An excellent material for further investigation is furnished by such chick embryos as will overlive an aggression as implied by the dose in question causing in all cases the death of not infected guinea pigs and mice.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BANG, F. B. 1943. *The Course of Experimental Infection of the Chick Embryo with the Virus of Equine Encephalomyelitis*. J. Exp. Med. **77**: 337-344.
- (2) BEARD, J. W.; D. BEARD and H. FINKELSTEIN. 1940. *Vaccination of Man Against the Virus of Equine Encephalomyelitis. (Eastern and Western Strains)*. J. Imm. **38**: 117-136.
- (3) EICHORN, A., and R. W. C. WICKOFF. 1938. *Immunological Studies on Equine Encephalomyelitis*. J. Am. Med. Vet. Ass. **93**: 285-290.
- (4) HIGBIE, E., and B. HOWITT. 1935. *The Behavior of the Virus of Equine Encephalomyelitis on the Chorioallantoic Membrane of the Developing Chick*. J. of Bact. **29**: 399-405.
- (5) LEVINE, N. D., and R. GRAHAM. 1942. *III Non Pathogenic for Chicks of Western Equine Encephalomyelitis Virus*. Vet. Med. **37**: 116-117.
- (6) MOHLER, W. M. 1939. *Complement Fixation with Chick-Embryo Antigen in Encephalomyelitis*. J. Am. Med. Vet. Ass. **94**: 39-43.
- (7) OLITSKY, P. K., and C. G. HARFORD. 1938. *Intraperitoneal and Intracerebral Routes in Serum Protection Tests with the Virus of Equine Encephalomyelitis. III Comparison of Antiviral Serum Constituents from Guinea Pigs Immunized with Active or Formolized Inactive Virus*. J. Exp. Med. **68**: 779-787.
- (8) — — .1938. *Intraperitoneal and Intracerebral Routes in Serum Production Tests with the Virus of Equine Encephalomyelitis. I. A. Comparison of the two Routes in Protection Tests*. J. of Exp. Med. **68**: 173-189.
- (9) OLITSKY, P. K., and P. H. LONG. 1929. *Relation of Vaccinal Immunity to the Persistence of the Virus in Rabbits*. J. Exp. Med. **50**: 263-272.
- (10) PIRES, A.; L. F. ACKERMAN; N. L. CUCULLU; D. MOSTO y M. POLAK. 1940. *Consideraciones generales sobre la vacunación contra la encefalomyelitis infecciosa de los yeguarizos (vacuna embrión de pollo) y estudio anatómopatológico de las membranas corioalantoides*. Tall. Gráf. L. López y Cía. Rioja 666, Bs. Aires. 28 pág., 7 fotos, 8 fotomicrog.
- (11) REED, L. J., and H. MUENCH. 1938. *A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints*. Am. J. Hyg. **27** (3): 495-499.
- (12) THEILER, M. 1937. *Spontaneous Encephalomyelitis of Mice, a New Virus Disease*. J. Exp. Med. **65**: 705-719.

- (13) TRAUB, E., and C. TEN BRECK. 1935. *Protective Vaccination of Horses with Modified Equine Encephalomyelitis Virus*. Science **81**: 572-579.
- (14) SABIN, A. B., and P. K. OLITSKY. 1938. *Age of Host and Capacity of Equine Encephalomyelitic Viruses to Invade the CNS*. Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. **38**: 595-599 (9949 P).
- (15) — —. 1938. *Variations in Pathways by which Equine Encephalomyelitis Viruses Invade the CNS of Mice and Guinea Pigs*. Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. **38**: 595-599 (9948 P).
- (16) TYZZER, E. E., and A. W. SELLERS. 1941. *The Pathology of Equine Encephalomyelitis in Young Chickens*. Am. Int. Hyg. **33**: B, pp. 69-81.
- (17) TYZZER, E. E.; A. W. SELLERS, and B. L. BENNETT. 1938. *The Occurrence in Nature of « Equine Encephalomyelitis » in the Ring-Necked Pheasant*. Science **88**: pp. 505-506.
- (18) VAN ROECKEL, H., and M. K. CLARKE. 1939. *Equine Encephalomyelitis Virus (Eastern Type) Isolated from Ring-Necked Pheasants*. J. Am. Med. Vet. Ass., **94**: 466.
- (19) WYCKOFF, R. W. G. 1937. *Ultracentrifugal Concentration of a Homogeneous Heavy Component from Tissues Diseased with Equine Encephalomyelitis*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **36**: 771-773.
- (20) WEBSTER, L. T., and A. D. CLOW. 1936. *The Limited Neurotropic Character of the Encephalitis Virus (St. Louis Type) in Susceptible Mice*. J. Exp. Med. **63**, 433-448.
- (21) — —. 1936. *Experimental Encephalitis (St. Louis Type) in Mice with High in Born Resistance*. J. Exp. Med. **63**: 827-845.