

BOLETIN de la

# Oficina Sanitaria Panamericana

---

Año 33    r    Vol. XXXVI    r    Encro 1954    r    No. 1

---

## INVESTIGACIONES RECIENTES SOBRE LAS CUALIDADES INTRINSECAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA\*

### ASPECTOS SOMATICOS Y GENETICOS

Por Sir MACFARLANE BURNET, F.R.S.

*Director, Instituto Walter y Eliza Hall de Investigaciones Médicas,  
Melbourne, Australia*

Durante los últimos siete u ocho años, el Instituto Walter y Eliza Hall se ha dedicado a un programa continuo de investigaciones relacionadas con lo que podríamos llamar las cualidades intrínsecas de los virus de la influenza, en contraposición con las investigaciones que se refieren más directamente a la relación que existe entre el virus y los aspectos clínicos y epidemiológicos de dicha enfermedad. De esta labor ha surgido el concepto que representa la partícula viral como una doble entidad que se compone, igual que cualquier otro microorganismo viviente, de constituyentes somáticos y genéticos. Como en las demás ramas de la biología, las propiedades del soma pueden ser estudiadas por lo que podríamos llamar métodos fisiológicos y bioquímicos, mientras que las propiedades del aparato genético (que por conveniencia designaremos con el nombre de "genoma", para establecer con una sola palabra el equilibrio y contraste con "soma") son estudiadas por completo desde el punto de vista genético. Todos los caracteres fenotípicos se encuentran expresados en el soma y, del mismo modo que un microorganismo superior se desarrolla totalmente de un cigoto, el soma del virus de la influenza es reconstruido en cada generación por el genoma.

### CUALIDADES SUPERFICIALES (SOMATICAS) DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

En términos generales, todos los caracteres que permiten diferenciar el virus de la influenza en el laboratorio se basan en cualidades superficiales, por ejemplo, rasgos serológicos, actividad como hemaglutininas y enzimas y adsorción hacia la superficie de las células huéspedes sus-

\* Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 8, No. 5-6, 1953, pp. 661-682.

ceptibles. La intensidad del daño producido en las células infectadas es la única característica que se puede considerar como algo que no está directamente asociado con los aspectos superficiales del virus.

Los aspectos serológicos de los virus de la influenza se estudian en otros trabajos.\* En la presente ocasión, lo único que se puede decir es que no se han efectuado investigaciones que indiquen la naturaleza química de los antígenos superficiales de los virus de la influenza. Ya es sabido que la adsorción a la superficie de células rojas no se produce en presencia de un anticuerpo, aunque ello no quiera decir necesariamente que las características de adsorción que se explicarán en el presente trabajo sean los determinantes antigénicos efectivos. Como toda cualidad hereditaria, el comportamiento del antígeno es determinado por el genoma. Las investigaciones recientes de Hirst (40) sugieren de modo convincente que las alteraciones genéticas que ocurren en los antígenos pueden representar el reemplazo acentuado de un determinante genético por otro.

La acción recíproca entre el virus y la superficie celular se ha estudiado principalmente en relación con la hemaglutinación, pero se dispone de evidencia adecuada para justificar la aserción de que todos los hallazgos esenciales que se han establecido en relación con la superficie de los glóbulos rojos son también aplicables a la superficie de las células susceptibles, incluidas las del conducto respiratorio de los mamíferos y las que cubren la cavidad alantoica del embrión de pollo.

### HEMAGLUTINACIÓN

En 1941, Hirst (36) por una parte, y McLelland y Hare (45), por otra, demostraron independientemente que el líquido alantoico infectado aglutinaba los glóbulos rojos del pollo. Pocos años después se demostró claramente que el agente aglutinante era el propio virus (Friedewald y Pickels (33)). Más adelante se introdujo una modificación de menor importancia a este criterio, como resultado de las investigaciones realizadas por von Magnus (47) en el virus "incompleto". Bajo ciertas condiciones, cuando se emplea una cantidad grande de virus para inocular embriones de pollo en la cavidad alantoica, el líquido que se obtiene a las 21 horas posee un índice de infecciosidad:hemaglutinina mucho menor que el obtenido con una dosis infectante muy pequeña. En el caso del primer tipo de líquido, se supone que hasta el 90 % de las partículas virales son incapaces de iniciar la infección a pesar de que poseen las cualidades morfológicas, serológicas y adsorbentes del virus normal.

En los líquidos virales totalmente activos existe una relación constante entre el 50 % del límite de infecciosidad ( $ID_{50}$ ), medido de acuerdo

\* Hilleman, M. R.; Werner, Jacqueline H., y Gauld, R. L.: Influenza antibodies in the population of the USA: An epidemiological investigation, *Bull. World Health Org.*, 8:613, 1953; Lépine, Pierre: Méthodes de laboratoire appliquées a l'étude du virus grippal, *Ibid.*, p. 683.

con la infección alantoica, y la dosis aglutinante mínima (AD) de un líquido determinado. De acuerdo con las técnicas empleadas en Melbourne, un líquido cuyo título de hemaglutinina es de 100, mostrará  $10^{8.2}$  ID<sub>50</sub> por ml. Un AD =  $10^{6.2}$  ID<sub>50</sub> (Cairns, Fazekas de St. Groth y Edney (24)).

Al reaccionar los virus del grupo de la influenza con los glóbulos rojos, lo único que tienen en común es que se produce la unión con la superficie celular, y si el virus está presente en cantidades suficientes, es decir, más de una partícula de virus aproximadamente por cada diez glóbulos rojos, la hemaglutinación se puede descubrir por una alteración de la forma de sedimentación. Un estudio más detallado demostrará que ocurre una serie de acciones recíprocas diferentes. Si en el grupo incluimos los virus de la enfermedad de Newcastle (ND) y de la parotiditis, se pueden observar en condiciones apropiadas los siguientes fenómenos: (a) hemaglutinación; (b) elución del virus con estabilización de las células y pérdida de los "receptores" afectados; (c) efecto del gradiente de receptividad, por ejemplo, cuando las células, después de haber sido tratadas con un virus, pierden su susceptibilidad de aglutinación por ese virus, pero pueden conservar la capacidad de aglutinación por otros virus del grupo; (d) disminución de la movilidad electroforética (EPM) después de la acción del virus; (e) modificación de los caracteres antigénicos después de la acción del virus—descubrimiento del aglutinógeno-T; (f) unión irreversible del virus a la superficie celular, la cual se puede demostrar por la capacidad de las células tratadas para aglutinar las células normales y para ser aglutinadas, a su vez, por los sueros antivirales; (g) hemólisis por los virus de la enfermedad de Newcastle y de la parotiditis.

Cada uno de estos fenómenos requiere alguna explicación, pero es conveniente que consideremos primero la enzima viral que es el rasgo principal de la mayoría de estos fenómenos. Hirst (37) observó en 1942 que si se permitía que el virus ejerciera su acción sobre los glóbulos rojos durante algunas horas a 37°C, desaparecía la aglutinación inicial, se liberaba nuevamente el virus en la solución y las células, después de lavadas y probadas, dejaban de ser aglutinables por el virus. El virus nuevamente liberado seguía conservando todas las propiedades necesarias para inducir el mismo ciclo de adsorción, aglutinación, elución y estabilización en un nuevo grupo de glóbulos rojos, y Hirst sugirió inmediatamente que el virus se comportaba en este respecto como una enzima típica cuyo substrato era un componente superficial de la célula, designado convenientemente con el nombre de sustancia receptora. Este concepto ha sido plenamente corroborado por investigaciones posteriores, analizadas en un trabajo de Burnet (9). Sin entrar en una descripción detallada del proceso mediante el cual se llegó a estas conclusiones, cabe señalar que los virus del grupo contienen, como parte de sus superficies, grupos químicos de función enzimática que llevan como

substrato otros grupos que contienen carbohidratos de una variedad de mucoproteínas y (probablemente) mucopolisacáridos. Se puede obtener una enzima soluble que actúe precisamente sobre esos mismos sustratos utilizando cultivos del *Vibrio cholerae* y concentrándolos a un grado relativamente alto de pureza (Ada y French (2)). Tanto la enzima viral como la enzima soluble (enzima) destructora del receptor (RDE), además de modificar la superficie de los glóbulos rojos, actúan rápidamente sobre las mucoproteínas solubles, pudiéndose demostrar su efecto: (a) por la destrucción de su capacidad de inhibir la hemaglutinación que produce el virus "indicador"; (b) por los cambios en el comportamiento electroforético (Ada y Stone (4)); y (c) por la separación de la mucoproteína de una unidad isoglucosaminopéptida (Gottschalk (34)).

**Acción normal de los virus de la influenza sobre los glóbulos rojos.**— En cierto modo podemos concebir la superficie del glóbulo rojo como un mosaico de lípidos, proteínas y mucopolisacáridos y, en lo que concierne a las reacciones del virus de la influenza, como una malla floja de macromoléculas de mucopolisacáridos que cubren toda la extensión de la superficie celular y se encuentran integradas con los demás componentes de la superficie. Dado el carácter general de estos mucopolisacáridos, también pueden existir cabos sueltos de macromoléculas que sobresalgan de la superficie.

El primer aspecto de la adsorción que requiere una explicación es la necesidad de que haya iones presentes en el sistema (Burnet y Edney (16)), y la mayor eficacia de los iones de  $\text{Ca}^{++}$  sugiere que los cationes son los que están principalmente afectados. De conformidad con la hipótesis de Puck, Garen y Cline (48) referente a la adsorción del fago a la bacteria huésped, cabe decir que la adsorción primaria del virus al glóbulo rojo es electrostática, debida a la cual se produce una aposición primaria no orientada de los centros reactivos del virus y de la superficie celular. Todo indica que esta adsorción primaria es el factor principalmente responsable de la hemaglutinación. Puesto que la acción enzimática del virus o del RDE incapacita a la célula para adsorber el virus, es lógico suponer que la adsorción es primordialmente una función de la enzima y del sustrato, o más concretamente, del agrupamiento activo, E, de la enzima y de los correspondientes grupos de unión del sustrato. En nuestra opinión (Burnet (10)), la mejor forma de explicar estos fenómenos es la de suponer que, en presencia de cationes apropiados, los grupos E y S están cargados en tal forma que existe una atracción electrostática substancial entre ellos. Esta bastará para sujetar cualquier partícula viral en la superficie celular por medio de cierto número de enlaces E-S y, cuando se trata de más de una célula, para formar un puente por medio del cual se puedan unir y aglutinar las células. Una vez que se haya logrado establecer esta serie de uniones primarias, se puede producir la orientación mutua de E y S que permite que entren en juego las fuerzas de corto alcance. El resultado más corriente es la destrucción enzimática

de S con el rompimiento del enlace correspondiente que une al virus con la superficie celular. Ada y Stone (4) han aportado evidencia directa de que una sola partícula de virus puede, por así decirlo, "pacer" sobre la superficie del glóbulo rojo. A medida que se disuelve un enlace E-S, surge la oportunidad de formar otro; es decir, el virus está destruyendo receptores continuamente, pero se encuentra siempre retenido por un número suficiente de enlaces para mantenerlo en la superficie celular.

La acción recíproca que existe entre la enzima del virus y su substrato se halla complicada por el hecho de que ambos agentes se encuentran en la superficie de portadores relativamente masivos y están integrados en formas moleculares complejas que dan lugar a que puedan producirse diversos tipos de interferencia. Al parecer, la enzima soluble RDE es capaz de eliminar todos, o casi todos, los grupos S que se encuentran en la superficie celular. Sin embargo, un virus cualquiera sólo es capaz de destruir una proporción más o menos uniforme de los grupos S, presuntivamente porque la interferencia existente entre las agrupaciones moleculares adyacentes impide todo contacto efectivo con los restantes grupos S. Con alguna excepción ocasional de menor importancia, los virus pueden estar colocados en un orden lineal, lo que Burnet, McCrea y Stone (22) llaman el gradiente de receptividad, de manera que los virus que aparecen más tarde en el gradiente aun pueden aglutinar las células que han sido tratadas y convertidas en inaglutinables por los virus que se encuentran en una posición anterior del gradiente. El gradiente de receptividad se puede demostrar más convenientemente por medio del tratamiento de células con cantidades graduadas del RDE, deteniéndose la acción después de un período determinado. Esto resulta en un orden aproximadamente igual, con la importante excepción de que el virus de la parotiditis aparece mucho más tarde en el gradiente de la RDE; es el primero cuando se utilizan los virus. Las modificaciones que se producen en el EPM proporcionan un índice sumamente útil de las alteraciones inducidas por esas enzimas en los glóbulos rojos. En el caso de las células humanas que normalmente tienen una EPM de 1.30 micras por segundo por voltio por cm, la acción total del RDE reduce el valor a 0.17. Ada y Stone (4, 54, 55) han hecho un estudio detallado de este fenómeno en una serie de trabajos. Los resultados son demasiado complejos para poder analizarlos en el presente artículo, pero conducen a la muy interesante conclusión de que existen dos series de receptores en las células humanas, de las cuales hay una sola disponible para la acción de aglutinación de los virus normalmente empleados en este trabajo. La presencia de la otra serie se puede demostrar por su contribución a la EPM; estos receptores pueden ser destruidos por el RDE y por dos virus: el de la enfermedad de Newcastle y el de la influenza porcina. Las recientes investigaciones de White (59) sugieren de modo convincente que en la aglutinación por el virus de la influenza C, interviene una pequeña fracción de los receptores de esta segunda serie.

Un importante descubrimiento que se realizó en los primeros trabajos de investigación sobre la hemaglutinación, fué el de que las células tratadas con virus y estabilizadas podían ser aglutinadas con diluciones bajas de cualquier tipo de suero (Burnet, McCrea y Stone (22)). El reconocimiento de la similitud existente entre esta observación y el fenómeno de Thomsen (58) llamado "panaglutinación", llevó al descubrimiento del RDE. La aglutinina del suero humano normal que produce este efecto, es conocida generalmente por el nombre de "aglutinina-T (Thomsen)". Lind y McArthur (43) han descrito su distribución en el suero humano. Se halla ausente en el suero de las criaturas y tiende a aumentar en el suero que presenta aglutininas frías. Se desconoce la naturaleza de las aglutininas-T. Hay que considerar la posibilidad de que sean un agente no específico que actúa sobre las células tratadas con la RDE en virtud de la disminución de la carga electronegativa del virus. Recientemente se ha demostrado que estas células son también aglutinadas por la mucoproteína urinaria purificada y por el rojo Congo (Burnet (12)). Se ha obtenido evidencia indicativa de que en las células tratadas con RDE se producen o se descubre la presencia de nuevos grupos antigénicos. Cuando se inmuniza un conejo con células humanas tratadas con RDE y el suero es absorbido completamente por las células humanas normales, siempre queda una capacidad residual para aglutinar las células tratadas (Burnet y Anderson (14)).

**Efecto del calor en la hemaglutinina del virus de la influenza.**— Francis (30) demostró que al calentar la cepa Lee de la influenza B a 56°C durante 30 minutos, el título de la hemaglutinina permanecía inalterado. Sin embargo, al utilizar ese virus calentado para titular los sueros en cuanto a su capacidad para inhibir la hemaglutinina, se descubrió que el suero normal poseía un elevado título inhibitorio. El examen de este fenómeno demostró que la inhibición del virus Lee calentado era producida por las mucoproteínas séricas y que cualquier otra variedad de mucoproteínas que no fueran las contenidas en el suero eran igualmente eficaces. Entre las preparaciones purificadas o semipurificadas que se han analizado figuran las siguientes: clara de huevo (ovomucina: Gottschalk y Lind (35)), mucoproteína urinaria (Tamm y Horsfall (57); Ada y Gottschalk (3); Burnet (12); meconio (French, Curtain y Pye (31)), y esputo humano (Curtain, Marmion y Pye (25)). Asimismo, ciertas preparaciones crudas obtenidas de una variedad de mucinas glandulares y de algunos contenidos de quistes ováricos son también activas (French, Gunter y Motteram (32)). McCrea (46) también ha preparado sustancias altamente activas con los estromas de los glóbulos rojos humanos y con glándulas salivales de oveja. El inhibidor activo de todas estas sustancias es destruido enzimicamente tanto por el virus Lee activo no calentado como por la RDE. El virus Lee calentado no posee actividad enzimica y todos los experimentos han evidenciado una correlación completamente negativa entre la actividad enzimica y lo

que hemos llamado el estado del indicador, esto es, el virus en que la hemaglutinina es inhibida a un título alto por los inhibidores mucoproteicos.

Como sería de esperar, el virus indicador no se libera espontáneamente de los glóbulos rojos que lo han adsorbido. Si la aglutinación se produce a la temperatura ambiente, se puede invertir el proceso y estabilizar las células por la aplicación de un antisuero Lee diluído. En el caso de las células de pollo, la aglutinación por el virus Lee calentado a 37°C resulta en una unión firmemente irreversible (Burnet (11)). Las células pueden ser estabilizadas con un tratamiento de la RDE al objeto de remover todos los receptores inactivos, pero la existencia de un virus firmemente ligado puede entonces demostrarse por la capacidad de aglutinación de las células por el antisuero Lee inmune. Este fenómeno de unión firme por el virus indicador Lee, también se produce con el virus indicador Mel, pero no con cualquiera de los virus activos ni con las células humanas.

Excepción hecha de dos variantes poco usuales, todos los virus de la influenza A y B pueden ser convertidos a este estado de indicador, ya sea por el simple procedimiento de calentarlos o por la aplicación de calor en presencia de un agente que le reste iones al calcio en una reacción alcalina (Stone (52); Edney y Burnet (26)). La correlación negativa que existe entre la actividad enzimica y el estado de indicador es siempre constante, pero actualmente la conversión tiende a ser menos definida en una cepa como la Mel, que en la cepa Lee (Edney y Burnet (26)).

La naturaleza del cambio al estado de indicador ha sido estudiada ampliamente (Burnet (8, 9); Smith (49)) y aunque no se puede decir que la interpretación haya sido aceptada universalmente, el autor sigue opinando que es preciso suponer que ocurre una inactivación de la capacidad de los grupos enzimicos para separar el substrato, reteniendo sin embargo la relación de adsorción específica al substrato. En el caso de la unión firme que muestra el virus Lee, se debe considerar que es un resultado alternativo producido por la fase secundaria de la acción recíproca orientada.

**Acción recíproca entre los virus de la parotiditis y de la enfermedad de Newcastle y los glóbulos rojos.**—Los virus de la parotiditis y de la enfermedad de Newcastle afectan los mismos receptores que los virus A y B de la influenza, pero poseen en cambio algunas diferencias características, entre las cuales la más notable es su capacidad de hemolizar las células. A pesar de que las investigaciones han prestado más atención al virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), las experiencias realizadas con el virus de la parotiditis, aunque limitadas, han producido resultados esencialmente similares. A los fines del presente trabajo el comportamiento de estos dos virus sólo es pertinente en su conexión con la interpretación de los resultados obtenidos con el virus de la influenza, por lo cual nos limitaremos a hacer un breve relato de las reacciones del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

La mayoría de las cepas del NDV demuestran una estabilización rápida de las células aglutinadas inicialmente, pero se observa fácilmente que estas células contienen virus de actividad enzimica firmemente ligado. Cuando se lavan para separar los virus que no están ligados, producen la aglutinación que, al dejarla en reposo a 37°C, se dispersa espontáneamente. Las células tratadas pueden ser aglutinadas por el antisuero inmune NDV y, en el caso de la cepa Victorian, por diluciones altas de suero obtenido en la mayoría de enfermos de mononucleosis infecciosa (Burnet y Anderson (13)). De acuerdo con nuestra experiencia, limitada a la cepa Victorian, esta unión firme solamente se produce a temperaturas mayores de 30°C. A la temperatura ambiente el virus se comporta en todos los aspectos como un virus típico de la influenza.

La hemólisis que produce el virus de fluído alantoico no tratado es variable e incompleta. Si el virus ha sido parcialmente purificado por la precipitación de metanol en frío (Burnet y Lind (18)), o si ha sido congelado y descongelado repetidas veces después de la diálisis (Henle, comunicación personal; Liu (44)), adquiere una actividad hemolítica mucho más pronunciada, especialmente en lo que concierne a los eritrocitos humanos. El proceso hemolítico parece ser esencialmente similar al del establecimiento de una unión firme en dos aspectos importantes: (1) el tratamiento previo de las células con RDE las hace insusceptibles por igual a la hemaglutinación, a la adsorción firme y a la hemólisis por parte de las preparaciones activas del NDV; (2) a temperaturas inferiores a 30°C no se produce la hemólisis ni la unión firme.

En un trabajo preparado por Burnet y Lind (18) aparece una descripción de la cinética del proceso hemolítico.

No se ha notificado evidencia alguna de hemólisis producida por el virus de la influenza, y su única conexión con las reacciones del virus de la influenza estriba en una posible relación con la unión firme que presentan el virus Lee calentado y el virus activo contra el substrato tratado con peryodato.

**Naturaleza de la enzima del virus de la influenza.**—La primera clave sobre la naturaleza de la enzima incorporada a la superficie del virus de la influenza, fué el hallazgo de Hirst (39) de que los glóbulos rojos tratados con peryodato perdían su susceptibilidad a la aglutinación que produce el virus. Esta observación sugirió concluyentemente que las unidades de carbohidrato tienen estrecha intervención en este respecto. Desde entonces se ha seguido reuniendo gradualmente evidencia indicativa de que ciertos grupos de carbohidratos incorporados a las mucoproteínas y a los mucopolisacáridos integran el grupo esencial del substrato S. Por lo tanto, se puede clasificar esta enzima como una mucinasa.

La verdadera naturaleza de la agrupación S aun no ha sido esclarecida. Las investigaciones de Gottschalk (34) señalan la posibilidad de que comprendan una unidad de isoglucosamina ligada a un aminoácido o a

un péptido de cadena corta. La ovomucina libera una substancia de este tipo por la acción que ejerce el virus Mel. El análisis completo de esta substancia ha sido impedido hasta la fecha por el hecho de que la hidrólisis la convierte en substancias húmicas. Todas las substancias purificadas estudiadas contienen glucosa, manosa, fucosa, y hexosamina, además de los aminoácidos. Una interesante confirmación de la naturaleza mucoproteica del substrato es el hallazgo por Whitten en el sentido de que cualquiera de los tres tipos de hormona gonadotrópica normalmente disponibles pierde su actividad biológica al ser tratado con virus Lee o con RDE (Whitten (60)).

Además de esta evidencia química, la acción de la enzima viral en las mucoproteínas puede ser demostrada de otras varias maneras.

(1) Cuando se dispone de un substrato electroforéticamente puro, la aplicación de virus a la mucoproteína urinaria (Tamm y Horsfall (57); Ada y Gottschalk (3)), al inhibidor de meconio (French, Curtain y Pye (31)), o al inhibidor de esputo (Curtain, Marmion y Pye (25)) produce una reducción progresiva de su carga negativa. En el diagrama electroforético el punto máximo es siempre sencillo, pero cambia bruscamente en la dirección de la movilidad reducida. El inhibidor de meconio presenta un punto máximo ampliamente difuso; sin embargo, bajo la acción del virus cambia totalmente, indicando que la población del inhibidor es, hasta cierto punto, físicamente heterogénea, aunque funcionalmente homogénea. En el caso de los inhibidores solubles, el cambio es esencialmente equivalente al del EPM reducido que se demuestra por un procedimiento diferente con glóbulos rojos tratados.

(2) Ya hemos hecho referencia a la destrucción por la RDE y por el virus activo de la acción que ejercen las mucoproteínas contra la hemaglutinación por los virus indicadores. Esta es la primera y más sencilla forma de demostrar la acción enzimática contra un substrato soluble (Burnet (6)).

(3) Cuando se aplica un tratamiento de concentraciones mínimas de peryodato al substrato celular o al soluble, ocurrirá una combinación irreversible bien sea del virus activo o del indicador. En el caso de los glóbulos rojos, se puede obtener una interesante serie de reactivos, tratando sucesivamente a las células con cantidades apropiadas de peryodato, virus y RDE. Estas células "PVR" (Fazekas de St. Groth (29)) son estables y son aglutinadas por el suero inmune correspondiente; si se ha empleado el virus indicador en su tratamiento, también son aglutinables por los inhibidores mucoproteicos. Al tratar la mucoproteína con cantidades graduadas de peryodato, se encontrará por regla general un nivel en el que el efecto inhibitorio contra el virus indicador permanece inalterado, y aparece entonces un nuevo factor inhibitorio contra la hemaglutinación por el virus activo (Burnet (7)). Si se sigue aumentando la cantidad de peryodato, se destruye toda la acción inhibitoria de la mucoproteína.

Es preciso que se realicen más investigaciones al objeto de definir el primer efecto del peryodato en el substrato, pero al parecer la acción consiste esencialmente en permitir la unión primaria seguida de una orientación secundaria, la cual, no obstante, da por resultado no una ruptura enzimica del substrato, sino más bien una unión química.

#### ACCIÓN RECÍPROCA ENTRE EL VIRUS Y LA SUPERFICIE CELULAR SUSCEPTIBLE

Desde el punto de vista del carácter intrínseco del virus, muy poca ha sido la información adicional que han producido los experimentos en que el glóbulo rojo ha sido substituído por las células susceptibles del conducto respiratorio o de la cavidad alantoica de los ratones. En la preparación *in vitro* del pulmón de ratón o de hurón, el proceso general de adsorción y elución es el mismo (Hirst (38); Fazekas de St. Groth (28)). La destrucción de los receptores por el RDE resulta en una insusceptibilidad transitoria del tejido a la infección (Stone (50, 51)).

El punto que tiene quizá el mayor interés con respecto al presente trabajo es el cambio en el carácter enzimico del virus asociado con el cambio O-D (fase original; fase derivativa) en los virus de la influenza A. Stone (53) ha demostrado que el virus O (patogénico humano) reacciona mal con un inhibidor avianizado (ovomucina) pero reacciona típicamente con uno de origen humano (quiste mucoide). Al completarse la adaptación a la cavidad alantoica con la adquisición de la capacidad para aglutinar células de pollo, el virus reacciona normalmente con ovomucina.

#### ASPECTOS GENETICOS DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

Hasta hace poco se creía generalmente que los estudios genéticos sobre los virus y las bacterias tenían que limitarse a investigaciones referentes a la frecuencia y a las mutaciones que aparecen particularmente en relación con el traslado a un medio diferente. Con el advenimiento de la genética microbiana, se ha puesto de manifiesto que existen posibles tipos de acción genética recíproca entre los microorganismos, que sólo tienen relación remota con la fusión sexual. La "recombinación" entre los virus bacterianos ya es bien conocida, y aunque las investigaciones realizadas en el propio laboratorio del autor no han sido confirmadas en otras partes, los resultados obtenidos han sido lo suficientemente sorprendentes y reproductibles para convencernos de que ocurre una recombinación muy similar en las células infectadas simultáneamente con dos virus diferentes de la influenza A.

#### EL CONCEPTO DE LA CLONA PURA EN VIROLOGÍA

Es cada vez más evidente que el conocimiento adecuado de las alteraciones que se producen en los virus sometidos a los diversos tipos de

manipulación requiere que se desarrolle un modo de enfoque técnico y lógico, análogo a las técnicas de "cultivo puro" empleadas en la bacteriología propiamente dicha desde los tiempos de Koch. Casi se puede decir que es inaudito el aislar más de una especie de virus de un caso natural de enfermedad, y se ha observado una tendencia general a considerar "un virus" como una entidad colectiva variable que siempre pasa de un huésped experimental a otro por la transferencia en masa de la substancia infecciosa, adaptándose a los nuevos huéspedes por medio de un proceso no especificado, presuntivamente "lamarekiano". Se necesita un estudio mucho más minucioso si es que ha de surgir una ciencia adecuada de la genética del virus. Cuando se traslada la infección viral de un huésped a otro, estamos presentando un problema que es esencialmente de genética de la población. Comenzamos con una determinada población de partículas virales, compuestas al parecer de cierto número de tipos variantes, y una vez efectuado el pase tenemos una población diferente, de distinta composición y que tal vez contiene nuevos mutantes que no se hallaban representados en la población inicial.

Antes de que podamos tratar de analizar estas situaciones, es necesario que sepamos si una población de virus, del virus de la influenza en el caso presente, puede ser considerada como equivalente a una población biológica normal, en el sentido de que cada unidad morfológica es también una unidad genética y producirá una descendencia similar, excepto en cuanto a que la mutación produce un nuevo tipo capaz de autorreproducción. El fenómeno del retardo fenotípico en la mutación bacteriana ya ha provocado dudas respecto a la validez de este punto de vista en los estudios de la población bacteriana, y es bastante probable que en el caso del virus de la influenza tengamos una situación algo indeterminada. Si las unidades que se llaman formas filamentosas son, como parece muy probable, unidades infecciosas, pueden contener material genético en una proporción varias veces mayor que el de las formas esféricas, aceptadas como la morfología normal del virus. Por ello es posible que una sola unidad morfológica sea portadora de dos o más unidades genéticas diferentes.

La experiencia obtenida con el virus de la influenza indica que cuando se comienza con dos cepas estándar de laboratorio, que pueden diferir en media docena de características, y se les aísla repetidas veces por pases alantoicos, cada una de ellas conservará sus características inalteradas. La aplicación del método del pase a la dilución de infecciosidad marginal (LD) permite determinar si se está utilizando un virus de clona pura. El método puede ser ilustrado por el siguiente ejemplo: cierto virus de fluido alantoico se caracteriza por seis cualidades designadas con las iniciales ABCDEF; luego se valora en embriones de pollo a diluciones de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$ , obteniéndose respectivamente flúidos

0/6, 3/6 y 6/6 que contienen virus. Los tres flúidos positivos a  $10^{-8}$  son sometidos a prueba, demostrándose que poseen las características ABCDEF. Uno de ellos se valora nuevamente y, cabe suponer, presenta la misma distribución de flúidos positivos. Si los tres flúidos a  $10^{-8}$  muestran de nuevo las características ABCDEF, entonces se puede aceptar que cualquiera de esos flúidos LD secundarios son clonas puras de esta determinada cepa.

Todo viene a indicar que para cuando una sola partícula viral se haya multiplicado para dar las partículas infecciosas  $10^{10\pm}$  en un flúido alantocò de infección promedio, ya se han producido algunas mutaciones. Sin embargo, excepto bajo condiciones extraordinarias, ningún mutante se habrá multiplicado en cantidad suficiente como para competir con la del tipo original. Los pases en la LD deben garantizar, por lo tanto, que una cepa determinada pueda conservarse en su forma original aunque surjan mutantes capaces de crecer más activamente que el tipo original en la cavidad alantoica. Por otra parte, si se hace una transferencia en masa de los inóculos se producirá una competencia entre los mutantes y, eventualmente predominará el que sobreviva con más eficacia. En cualquier etapa determinada pueden muy bien presentarse complicaciones graves como resultado de infecciones múltiples de una misma célula, con la producción de unidades morfológicas que contengan más de un complejo de genes. Incluso el pase LD de este flúido puede requerir varias aplicaciones sucesivas antes de que se obtengan flúidos consistentemente uniformes.

Aun con los virus de la influenza, este método de aislar las clonas puras resulta molesto y se halla sujeto a las imperfecciones intrínsecas que se acaban de examinar, pero parece ser el requisito mínimo para cualquier investigación seria sobre la genética de los virus de la influenza.

#### MUTACIÓN EN EL VIRUS A DE LA INFLUENZA

La labilidad de los virus de la influenza es conocida por todos los investigadores en esta materia. Como ejemplo de esta labilidad, tal vez sea interesante trazar el origen de dos subcepas del virus típico WS con las cuales hemos trabajado. El virus WS fué aislado en enero de 1933 de un individuo cuyo caso se suponía era típico de la epidemia bastante grave que en aquella época prevalecía en la Gran Bretaña. El virus, según se aisló, era patogénico para los seres humanos y para los hurones; no era patogénico para los ratones. A la luz de las investigaciones posteriores, podemos asegurar con fundamento que no se hubiera desarrollado en la cavidad alantoica del embrión de pollo, que ciertamente no hubiera producido lesiones en el corioalantoides y que probablemente hubiera aglutinado los glóbulos rojos humanos pero no los de las aves. Después de varios pases en hurones, se pasó el virus por vía intranasal en ratones donde, al cabo de algunos pases, desarrolló de un modo más bien repentino la capacidad para producir una consolidación pulmonar letal.

El virus en la forma adaptada a los ratones, fué enviado de Hampstead a Melbourne en 1936. Allí se pasó por el corioalantoides del embrión de pollo de 12 días. Al principio no se produjeron lesiones bien definidas, pero al cabo de 10 pases se observaron focos proliferantes definidos. A medida que se repetían los pases, estos focos proliferantes iban mostrando mejor desarrollo hasta que, entre los pases vigésimo y trigésimo, los embriones empezaron a resultar afectados. Al ejecutarse el cuadragésimo pase, los embriones morían invariablemente en un período de 60 horas, presentando lesiones hemorrágicas macroscópicas del cerebro y de los músculos. Esta cepa, mantenida subsiguientemente por medio de pases alantoicos no frecuentes y de la conservación en hielo seco, es la WSE (Burnet y Lush (21)).

Más tarde, Stuart-Harris, comenzando con un material similar, confirmó que las variantes del tipo WSE se pueden obtener por medio de pases corioalantoicos y después consiguió transferir el material infeccioso del cerebro embrionario al cerebro del ratón. Después de simplemente sobrevivir en él durante 11 pases, el virus comenzó a aumentar gradualmente su virulencia llegando con el tiempo a matar ratones a títulos altos, con síntomas encefálticos agudos. Al cabo de 100 pases por cerebro de ratón, la cepa se envió a Melbourne y, una vez transferida a la cavidad alantoica, representa nuestra cepa NWS (el "Neuro-flu" de Stuart-Harris (56)).

En el Cuadro No. 1 aparecen algunas de las diferencias principales que existen entre estas cepas. Sin un análisis específico del proceso, es imposible ser dogmático, pero existe la impresión arraigada de que cada uno de los cambios principales de patogenidad fué el resultado de varias etapas de mutación.

CUADRO No. 1.—*Características de los tres mutantes WS*

Mutante	Patogenicidad para el				Desarrollo en la cavidad alantoica	Termos- tabilidad (Actividad hemolítica (°C)	Conversión al indicador
	hombre	ratón		em- brión de pollo			
		intra- nasal	intra- cere- bral				
WS original. . . . .	+	-	-	-	?-	?	?
WSE. . . . .	-	+	-	+	++	60	+
NWS. . . . .	-	+	+	+	+	52	-

Existen muchos otros ejemplos de laboratorio de la variación que existe en los virus de la influenza (véase Burnet (8)), aunque hasta la fecha ninguno ha sido analizado adecuadamente por medio de técnicas genéticas. Mucho más importantes son las alteraciones en el carácter serológico, y quizá en la virulencia humana, que han ocurrido naturalmente en el virus de la influenza A desde 1933. La consideración de estos factores, sin embargo, queda fuera de la órbita del presente trabajo.

## RECOMBINACIÓN ENTRE LAS CEPAS DEL VIRUS A DE LA INFLUENZA

La primera evidencia de que podía ocurrir acción genética recíproca entre las cepas del virus de la influenza fué comunicada por Burnet y Lind (19, 20). Inocularon ratones por vía intracerebral con mezclas de la cepa neurotrópica NWS y de una cepa no neurotrópica de un subtipo serológico distinto, utilizándose el Mel en la mayoría de los experimentos. En condiciones apropiadas de dosis, se obtuvieron clonas puras del virus que desde el punto de vista serológico eran Mel, pero que también eran capaces de producir una encefalitis letal típica en los ratones. Por el mismo método general, se consiguieron otras tres cepas neurotrópicas que poseían las otras características de las cepas SW, Oc I y una WS termostábil. En el estudio de un gran número de formas N-Mel (Burnet y Edney (15)), se observó uniformidad general de características, con excepción del grado de patogenicidad de la inoculación intracerebral en los ratones. Se obtuvo cierto número de cepas que *in vitro* tenían todas las cualidades del N-Mel (aunque diferían considerablemente del NWS y del Mel) pero no poseían la capacidad de producir síntomas al practicarse la inoculación intracerebral en ratones. Appleby (5) también había obtenido de infecciones mixtas de NWS y de una cepa A reciente, una cepa neurotrópica con la característica serológica de la cepa reciente y sugirió la posibilidad de una recombinación.

Los estudios más extensos realizados durante el año último por Burnet, Fraser y Lind (17), y por Burnet y Perry (23), han suministrado otros muchos ejemplos de cepas que difícilmente pueden haberse producido por otro medio que no sea la acción genética recíproca. El ejemplo más sencillo que se puede analizar es el de las infecciones dobles de Mel y de WSE. Estas dos cepas A difieren en seis cualidades que se pueden demostrar fácilmente, de modo que, si las correspondientes a la cepa Mel se representan por las mayúsculas ABCDEF, las WSE se representarán por abcdef. Las cualidades de que se trata son las siguientes:

Aa: Tipo serológico WS o Mel, demostrado por las pruebas del inhibidor de hemaglutininas realizadas con sueros inmunes adecuados.

Bb: Termostabilidad: La hemaglutinina Mel resiste la aplicación de un calor de 62°C durante 30 minutos, mientras que la hemaglutinina WSE es destruída.

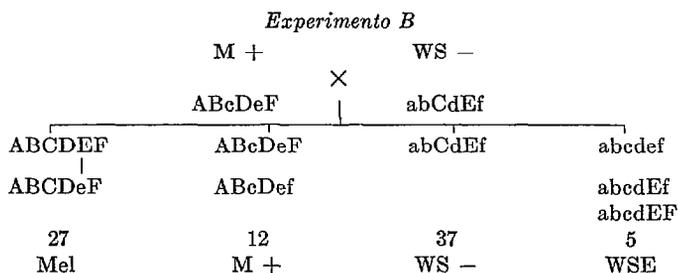
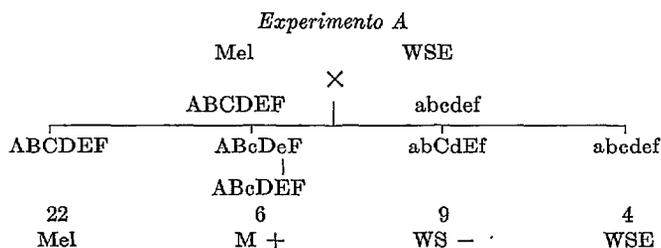
Cc: Conversión al "estado de indicador" por la simple aplicación de calor a 56°C durante 30 minutos: al probarse con el inhibidor de ovomucina o meconio, la hemaglutinina WSE calentada resulta fuertemente inhibida; el virus Mel calentado no es afectado, excepto en concentraciones sumamente altas.

Dd: Reactividad del virus calentado con el inhibidor de glándula salival de oveja (McCrea): el WSE es fuertemente inhibido; el tratamiento del Mel nunca ha producido una hemaglutinina inhibidora por esta substancia.

Ee: Producción de lesiones hemorrágicas en el embrión de pollo después de la inoculación en el corioalantoides: es característica del WSE pero nunca se manifiesta con el Mel.

Ff: Patogenicidad para ratones por medio de la inoculación intranasal: con una dosis equivalente a una unidad aglutinante, el WSE generalmente mata a todos los ratones a los cuatro o cinco días de la inoculación; el Mel produce lesiones no letales que se clasifican en 1-2 de acuerdo con la escala convencional.

Se pueden producir infecciones dobles en la cavidad alantoica substituyendo el fluido alantoico normal por un inóculo grande de virus mixto; una vez iniciada la infección, el inóculo no absorbido se elimina mediante un lavado. Una vez que está bien avanzada la liberación de virus en el primer ciclo, se recoge el fluido y se analiza su constitución probando grandes números de los fluidos LD obtenidos de titulaciones repetidas. A continuación se presentan esquemáticamente los resultados de dos extensos experimentos. En el primero, la doble infección de Mel y de WSE dió los dos recombinantes M + y WS -. Después que éstos fueron aislados repetidas veces, se realizó un experimento de "retro-recombinación" con los resultados expuestos en el segundo esquema.



La distribución de los cuatro tipos *in vitro* en los fluidos del primer ciclo se explica con los números que aparecen bajo cada grupo. En los casos en que hubo diferencias dentro del grupo con relación a las características Ee y Ff *in vivo*, se indican los tipos anormales obtenidos. La línea vertical que va de E a e significa que se obtuvieron cepas con grados intermedios de la capacidad de producir lesiones en los embriones de pollo.

Se puede considerar que estos resultados establecen que la recombinación

ción ocurre en una forma muy parecida a la de los virus bacterianos. Es obvio que la situación es compleja y para un análisis más claro de los procesos involucrados probablemente será necesario realizar un estudio de las cepas que difieren en etapas únicas de mutación. Los resultados de los dos grupos de experimentos indican de modo convincente que el desarrollo de la virulencia en un nuevo huésped es cuestión de una serie de mutaciones precisas. Debería ser técnicamente posible definir con bastante claridad cuántas etapas intervienen, por ejemplo, en la adaptación de un virus aislado en el embrión de pollo para que produzca una consolidación activa en el pulmón del ratón. Desde el punto de vista práctico, el hecho importante que se deduce de esta investigación es que es posible transferir la patogenicidad de una cepa del tipo serológico X a otra cepa del tipo serológico Y. Si se llegara a restablecer el uso de las vacunas de virus vivo contra la influenza, sería muy conveniente disponer de los medios adecuados para transferir con rapidez el nivel de virulencia de una cepa vacunal eficaz a cualquier nuevo tipo serológico que pudiera surgir en la naturaleza.

**Unidades morfológicas de caracteres genéticos mixtos.**—En el curso de las investigaciones sobre la recombinación de las cepas del virus A de la influenza, hemos observado con frecuencia que la titulación LD de un fluido que presentaba reacciones inequívocas *in vitro* de cierto tipo, producía fluidos de más de un tipo. En cada uno de nuestros trabajos se observará que hacemos referencia a las mezclas que están en proceso de disociación, o a las dificultades que se experimentan para obtener resultados uniformes con las titulaciones repetidas del LD. También hemos obtenido cierto número de fluidos cuya hemaglutinina era neutralizada significativamente por *ambos* antisueros. Desde luego, una mezcla no sería neutralizada por ninguno de ellos. Ninguno de estos fluidos ha mostrado fidelidad genética en la titulación del LD, pero ello no invalida la observación.

Sin pretender que ninguna otra interpretación sea posible, creemos que nuestros resultados son compatibles con la opinión de que las unidades morfológicas pueden contener más de un genoma y que son inexplicables si nos basamos en la suposición de que existe una relación genoma-soma definida en cada unidad. Por ejemplo, si la unidad morfológica promedio contuviera dos genomas discretos, los resultados de la titulación LD del fluido del primer ciclo obtenido en un experimento de recombinación en el cual se liberaron cuatro productos en número igual de las células de infección mixta, probablemente no rendirían un número igual de fluidos que mostrarán los cuatro caracteres fenotípicos. De conformidad con las cifras que aparecen en la sección sobre recombinación, y de acuerdo con las experiencias generales, parece probable que, si se inocularan mezclas binarias a dilución casi marginal, el tipo que aparecería dominante en el fluido final sería precisamente el que viene primero en la serie Mel, WS-, M+ y WSE. Se puede calcular que,

si el orden de dominación de fenotipos en una infección mixta fuera de esta misma naturaleza, y si pudiera ocurrir una recombinación libre en cada infección mixta, entonces el rendimiento de flúidos de cada tipo sería igual al que aparece en el Cuadro No. 2. Los resultados del experimento Mel  $\times$  WSE informado serían por lo tanto uniformes, y habría como promedio dos unidades de dos genomas cada una por cada unidad que llevara un solo genoma (serie B).

CUADRO No. 2.—*Distribución de los caracteres fenotípicos de los flúidos procedentes de infecciones dobles*

Serie	Distribución de flúidos (%)			
	Mel	WS -	M +	WSE
A: todas las unidades de dos genomas.....	56	19	19	6
B: promedio de una unidad con un genoma a dos unidades de dos genomas.....	46	21	21	12
C: promedio de una unidad con un genoma a una de dos genomas.....	40	22	22	16
D: todas las unidades de un genoma.....	25	25	25	25
E: hallazgos efectivos.....	56	23	15	10

Cualquier análisis ulterior de la situación dependerá de los conocimientos sobre la expresión fenotípica de los genotipos compuestos. En la presente etapa exploratoria de nuestras investigaciones todo lo que puede hacerse es considerar conjuntamente las distintas posibilidades, y esperar que en el futuro se pueda disponer de material experimental apropiado a fin de demostrar si un alelo es normalmente dominante sobre el otro (si es que esta terminología es legítima en situaciones de esta clase), o si ambos tipos de caracteres somáticos están expresados en la unidad que lleva los dos genomas.

Para simplificar, hemos dado por sentado que en todas las circunstancias hemos estado trabajando con genomas completos, 1, 2, 3 . . . por unidad morfológica. A priori, parece que no hay razón convincente para que ello sea cierto. Una unidad viral puede contener un número completamente variable de genes y ser viable únicamente si contiene por lo menos un alelo activo, por ejemplo, por cada diez genes específicos. Cada característica fenotípica podría determinarse por el predominio de éste o aquel alelo del gene que venga al caso, independientemente de que la unidad sea viable o no. Una interpretación del virus incompleto consiste en que las unidades interesadas carecen de uno o más de los genes necesarios para producir un complemento completo. La alternativa (que representa material somático producido bajo control génico pero que no incorpora ningún material genético), sugiere analogías con el virus del nabo amarillo, pero en conjunto parece mucho menos probable. A este respecto, las partículas de virus viable podrían contener, además del complemento necesario de genes, genes adicionales que modificarían

los caracteres fenotípicos de la población en que estas partículas representan la forma dominante y permitirían la emergencia de otros fenotipos en el pase LD.

Hay que hacer hincapié en que ninguna de las posibilidades enumeradas posee hasta la fecha un antecedente experimental reconocido. Todo lo que se sabe a ciencia cierta es que existen demasiadas irregularidades en los experimentos de recombinación para que puedan ser explicadas basándose en la suposición de que las potencialidades fenotípicas y genéticas de cada partícula son determinadas por un solo genoma de tipo estándar.

#### EL PROCESO DE MULTIPLICACION DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

En el presente estudio nos hemos esforzado en presentar los hechos esenciales y las deducciones de ellos derivadas que tienen relación con lo que hemos llamado los aspectos somáticos y genéticos del virus de la influenza. En este material no hay nada que tenga relación directa con la naturaleza del proceso de multiplicación del virus dentro de la célula susceptible, pero por otra parte, ninguna teoría del proceso mencionado puede ser aceptable a menos que concuerde con los hechos en estas dos categorías.

Las condiciones que existen en la cavidad alantoica del embrión de pollo son suficientemente sencillas y uniformes para hacer que el análisis de la multiplicación del virus de la influenza en este medio sea un proyecto atractivo. Actualmente existe gran cantidad de trabajos procedentes de una docena de laboratorios, de los cuales ha surgido un cuadro bastante uniforme. Si tomamos como modelo la cepa PR 8 totalmente adaptada e interpolamos, donde sean necesarios, los datos que provee la experiencia con otras cepas de la influenza A o con otros tejidos susceptibles, tenemos entonces que las características esenciales del proceso de multiplicación son las siguientes:

(1) La infección se inicia por la adsorción de una partícula de virus a los receptores mucoproteicos de la superficie celular (Stone (50, 51); Fazekas de St. Groth (27)).

(2) Una vez iniciada la infección, ocurre un período de eclipse de unas pocas horas durante las cuales no se puede extraer virus viable de las células infectadas.

(3) En alguna etapa antes de que el virus sea liberado espontáneamente en el fluido alantoico, se pueden extraer antígenos solubles fijadores del complemento, hemaglutininas y virus viable de las células infectadas que se han desintegrado. En opinión de la mayoría de los investigadores, el orden en que aparecen los tres agentes es el mencionado.

(4) La célula promedio infectada libera aproximadamente de 60 a 120 partículas infectivas en un período de dos a tres horas; el 50% de estas partículas son liberadas aproximadamente a las ocho horas de

haberse iniciado la infección (Cairnes, Fazekas de St. Groth y Edney (24)).

(5) La mayoría de las células no muestran signos de lesiones morfológicas graves en el momento de la liberación primaria de virus. El primer indicio de alteración es el aumento en la cantidad de material colorante de pironina ácido ribonucleico que se halla presente en el citoplasma. Es posible que después se produzcan lesiones macroscópicas (Bate, datos inéditos).

(6) La infección en ciclos después del primero se produce, al menos predominantemente, por medio del virus liberado en el fluido alantoico.

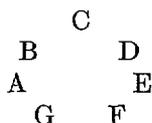
(7) La proporción de virus incompleto que se produce en la recolecta final está en proporción directa con el tamaño del inóculo. No se produce ningún virus incompleto capaz de ser reconocido si el inóculo es menor de  $10^5$  partículas (Cairns, Fazekas de St. Groth y Edney (24)).

(8) El antígeno soluble fijador del complemento es un agente compuesto de partículas mucho más pequeñas (diámetro de 10 a 15 milimicras) que el virus y posee características antigénicas específicas de la especie que se distinguen de las de cualquiera de los antígenos de partícula viral. Su componente principal es la nucléoproteína que contiene ácido ribonucleico y, excepto en el caso de su carácter antigénico específico, no puede ser distinguido de la fracción microsómica de las células normales (Ada (1)).

El proceso de multiplicación del virus en las bacterias ha sido estudiado minuciosamente durante algunos años y cualquier esfuerzo para establecer un cuadro de la multiplicación del virus de la influenza en la célula tiene que basarse necesariamente en gran medida en la analogía con el virus bacteriano.

El siguiente esfuerzo para interpretar el proceso de multiplicación del virus de la influenza en la célula es casi totalmente teórico. No obstante, representa una hipótesis de trabajo que ofrece muchas sugerencias para emprender futuras investigaciones y, por lo tanto, merece ser consignado. Está basado, evidentemente, en gran parte de las ideas de Luria, Delbruck, Hoyle (41, 42) y otros.

Al entrar el virus de la influenza en la célula, el soma queda descartado, y ya no desempeña ninguna otra función. En una partícula viral estándar, el genoma es un agregado lineal de genes que pueden ser representados por ABCDEFG o, como símbolo convencional para indicar la integridad del genoma, por



Las configuraciones mutiladas son de tal naturaleza que C, por ejemplo, solamente tiene enlace con B en un lado y con D en el otro; del mismo modo, A enlaza con B y con G; y así sucesivamente. Cuando el genoma

penetra en la célula, se inicia un proceso mediante el cual cada gene, ya sea por sí solo o en fragmentos lineales, por ejemplo, BCD ó EF, establece contactos eficaces con las unidades celulares (posiblemente de carácter microsómico) que pueden canalizar la energía y las "piedras de construcción", materiales que facilitan su repetición. Este material repetido, a su vez, estará sujeto ya sea a una ruptura, por ejemplo, BCD se convertirá en B, CD, o a un aumento por ejemplo, EF, GA se convertirá en EFGA; estos fragmentos a su vez encontrarán situaciones en que puedan repetirse. A medida que va aumentando el número de unidades contenidas en la mezcla de genes y de agregados génicos, la agregación alcanzará preponderancia sobre la disociación mediante simples consideraciones de acción en masa. En nuestra opinión, tan pronto como el nuevo genoma total

$$\begin{array}{ccc} & & C \\ & B & D \\ A & & E \\ & G & F \end{array}$$

queda reconstituido, adquiere estabilidad y es capaz de crearse un soma a su alrededor. Hasta la fecha no hay indicios, en las experimentaciones referentes al fago o al virus de la influenza, sobre la forma en que se produce este último proceso. Al alcanzarse cierta concentración de las partículas virales reconstruidas, tal vez por las lesiones asociadas en la superficie citoplásmica, comienza una filtración relativamente rápida de los virus en dirección al medio. En términos de los símbolos convencionales empleados para representar el genoma completo, existe una situación alternativa, FGABCDEFGA, que podría quizás representar una base genética para la forma filamentosa del virus y para la existencia aparente de unidades morfológicas que llevan las potencialidades de más de un tipo de descendencia en los experimentos de recombinación.

En los casos en que los virus pueden producir recombinantes viables, debe suponerse que las diferencias corresponden a las diferencias alélicas de ciertos genes, de manera que si un virus es representado por el símbolo ABCDEFG, otro puede serlo por A'BCD'EF'G. Conviene quizás destacar que hasta la fecha no es posible correlacionar las diferencias fenotípicas empleadas en nuestros experimentos de recombinación con ninguna clase de "mapa cromosómico", así como tampoco hay todavía sugestión alguna con relación al número de genes que pueden ser necesarios para una partícula de virus completa.

#### REFERENCIAS

- (1) Ada, G. L.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, vol. 31, 1953 (en prensa).
- (2) Ada, G. L., y French, E. L.: *Aust. Jour. Sc.*, 13:82, 1950.
- (3) Ada, G. L., y Gottschalk, A.: *Aust. Jour. Sc.*, 14:160, 1952.
- (4) Ada, G. L., y Stone, J. D.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 31:263, 1950.
- (5) Appleby, J. C.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 33:280, 1952.

- (6) Burnet, F. M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 26:389, 1948.
- (7) Burnet, F. M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 27:361, 1949.
- (8) Burnet, F. M.: En Doerr, R., y Hallauer, C.: *Handbuch der Virusforschung*, Wien, 2º Sup., p. 47, 1950.
- (9) Burnet, F. M.: *Physiol. Rev.*, 31:131, 1951.
- (10) Burnet, F. M.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 6:229, 1952.
- (11) Burnet, F. M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 30:119, 1952.
- (12) Burnet, F. M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 30:251, 1952.
- (13) Burnet, F. M., y Anderson, S. G.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 27:236, 1946.
- (14) Burnet, F. M., y Anderson, S. G.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 25:213, 1947.
- (15) Burnet, F. M., y Edney, M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 29:353, 1951.
- (16) Burnet, F. M., y Edney, M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 30:105, 1952.
- (17) Burnet, F. M.; Fraser, K. B., y Lind, P. E.: *Nature*, Londres, 171:163, 1953.
- (18) Burnet, F. M., y Lind, P. E.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 28:129, 1950.
- (19) Burnet, F. M., y Lind, P. E.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 5:59, 1951.
- (20) Burnet, F. M., y Lind, P. E.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 5:67, 1952.
- (21) Burnet, F. M., y Lush, D.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 16:261, 1938.
- (22) Burnet, F. M.; McCrea, J. F., y Stone, J. D.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 27:228, 1946.
- (23) Burnet, F. M., y Perry, B.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 31, 1953 (en prensa).
- (24) Cairns, H. J. F.; Fazekas de St. Groth, S., y Edney, M.: *Jour. Immunol.*, 69:155, 1952.
- (25) Curtain, C.; Marmion, B. P., y Pye, J.: *Nature*, Londres, 171:33, 1953.
- (26) Edney, M., y Burnet, F. M.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 30:129, 1952.
- (27) Fazekas de St. Groth, S.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 26:29, 1948.
- (28) Fazekas de St. Groth, S.: *Nature*, Londres, 162:294, 1948.
- (29) Fazekas de St. Groth, S.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 27:65, 1949.
- (30) Francis, T., Jr.: *Jour. Exp. Med.*, 85:1, 1947.
- (31) French, E. L.; Curtain, C. C., y Pye, J.: (en preparación), 1953.
- (32) French, E. L.; Gunter, G. S., y Motteram, R.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 29:23, 1951.
- (33) Friedewald, W. F., y Pickels, E. G.: *Jour. Exp. Med.*, 79:301, 1944.
- (34) Gottschalk, A.: *Nature*, Londres, 167:845, 1951.
- (35) Gottschalk, A., y Lind, P. E.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 30:85, 1949.
- (36) Hirst, G. K.: *Science*, 94:22, 1941.
- (37) Hirst, G. K.: *Jour. Exp. Med.*, 76:195, 1942.
- (38) Hirst, G. K.: *Jour. Exp. Med.*, 78:99, 1943.
- (39) Hirst, G. K.: Rep. Int. Health Bd., (Comm.), p. 50, 1945.
- (40) Hirst, G. K.: *Jour. Exp. Med.*, 96:589, 1952.
- (41) Hoyle, L.: *Jour. Hyg.*, Camb., 50:229, 1952.
- (42) Hoyle, L.: *Jour. Path. Bact.*, 64:419, 1952.
- (43) Lind, P. E., y McArthur, N. R.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 25:247, 1947.
- (44) Liu, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 81:646, 1952.
- (45) McClelland, L., y Hare, R.: *Canad. Jour. Publ. Health*, 32:530, 1941.
- (46) McCrea, J. F.: *Biochem. Jour.*, 48, xlix, 1951.
- (47) Magnus, P. von: *Acta path. microbiol. scand.*, 28:278, 1951.
- (48) Puck, T. T.; Garen, A., y Cline, J.: *Jour. Exp. Med.*, 93:65, 1951.
- (49) Smith, W.: *Lancet*, 1:907, 1952.
- (50) Stone, J. D.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 26:49, 1948.
- (51) Stone, J. D.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 26:287, 1948.
- (52) Stone, J. D.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 27:337, 1949.

- (53) Stone, J. D.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 32:367, 1951.  
(54) Stone, J. D., y Ada, G. L.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 31:275, 1950.  
(55) Stone, J. D., y Ada, G. L.: *Brit. Jour. Exp. Path.*, 33:428, 1952.  
(56) Stuart-Harris, C. H.: *Lancet*, 1:497, 1939.  
(57) Tamm, I., y Horsfall, F. L., Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 74:108, 1950.  
(58) Thomsen, O.: *Z. Immunforsch.*, 52:85, 1927.  
(59) White, J.: *Aust. Jour. Exp. Biol. Med. Sc.*, 31 (en prensa), 1953.  
(60) Whitten, W. K.: *Aust. Jour. Sc. Res.*, (Ser. B), 1:271, 1948.

### RECENT WORK ON THE INTRINSIC QUALITIES OF INFLUENZA VIRUS (*Summary*)

The intrinsic qualities of influenza virus particles may be studied at the biological level from two points of view:

(1) The surface structures associated with adsorption to the surface of the susceptible cell and entry into its substance are regarded as essentially somatic in character. Infection is possible only when these are present and functionally active.

(2) The somatic qualities are controlled by a genetic mechanism composed of functional units equivalent to the genes of higher organisms. Recombination experiments based on multiple infection of a single cell can provide a technical approach to the genetic analysis of influenza virus.

Work in these two fields is reviewed with special reference to that carried out in the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne.