

**EFFECTO DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR
INACTIVADO CON LUZ ULTRAVIOLETA,
SOBRE EL CRECIMIENTO DEL VIRUS DE LA RABIA
EN CULTIVOS CELULARES**

E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN ¹
I. MONDRAGÓN VÁZQUEZ ¹

Resumen

Se utilizaron cuatro series de tres botellas de Roux cada una, con cada uno de los siguientes tratamientos: 1. Un lote testigo sin virus. 2. Un lote infectado con virus de estomatitis vesicular inactivado con radiaciones ultravioleta (VSV-UV). 3. Un lote infectado solamente con virus de rabia. 4. Un lote infectado con VSV-UV y posteriormente infectado con virus de rabia. Se tomaron muestras cada hora durante 48 horas de cada una de las botellas y se titularon en la prueba de placas en suspensión en agarosa. El virus obtenido en el tratamiento cuatro, fue tratado con suero antirrábico monoespecífico y fue neutralizado completamente por el suero. La constante de producción de virus rábico en los tratamientos tres y cuatro fue de $K = 7.2 \times 10^{-10}$ y de $K = 8.4 \times 10^{-10}$, respectivamente. Como promedio de los experimentos, el período de latencia fue reducido en $2.5 \text{ hs} \pm 30$ minutos con respecto a los valores observados en el tratamiento tres. En virtud de los resultados obtenidos, es probable que la actividad de replicasa del virus de la estomatitis vesicular haya sido utilizada por el virus de la rabia. Estos resultados son preliminares y dado que el título final de virus fue el mismo, no se justifica la adición del VSV-UV a cultivos celulares para producción de vacuna, no sólo por el escaso efecto observado sino también por los riesgos de incluir ARN defectuoso de un virus diferente al que se desea producir.

El presente trabajo se realizó con objeto de tratar de mejorar el esquema de producción de la vacuna antirrábica en cultivos de tejidos, reduciendo tiempo y costos en la elaboración. El virus de la rabia pertenece a la familia Rhabdoviridae, dentro de la cual también se encuentran el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de Lagos, el virus de murciélagos de Monte Elgon y otros (Andrewes y Pereira, 1972; Fenner, 1976).

Para este estudio se usaron el virus de la rabia y el virus de la estomatitis vesicular, ya que poseen características fisicoquímicas muy semejantes. Algunas de las diferencias entre estos dos virus estriban en que el virus de la rabia no tiene antígeno común con ninguno de los serotipos de VSV, tiene Polimerasa de ácido ribonucleico (ARN) dependiente de ácido ribonucleico, conocida como transcriptasa (ARN-T). El tiempo de eclipse del

virus de la rabia es de 16 hs y el VSV es de 6 hs (Kaplan *et al.*, 1967).

Baltimore, Huang y Stampfer (1970) encontraron esta ARN-T en el VSV. Las consideraciones que los condujeron a postular la existencia de esta enzima fueron, en primer lugar, que el ARN extraído de virus de VSV no es infectante, a diferencia del ácido nucleico de los picornavirus y arbovirus; en segundo lugar, el hallazgo de que los ARN mensajeros encargados de sintetizar las proteínas víricas son complementarios en secuencias de nucleósidos 5' al ARN vírico. Consideraron que si el ARN vírico no es un mensajero, entonces debe servir como molde para la síntesis de ARN mensajero, ya sea usando una polimerasa celular u otra que sea parte del virus. En esas condiciones, Baltimore, Huang y Stampfer (1970) encontraron que las partículas B purificadas son capaces de sintetizar ARN *in vitro* cuando se encuentran los nucleótidos precursores en la reacción; la ausencia de uno de ellos condiciona que la reacción se detenga. Por lo tanto, existe una polimerasa que forma

Recibido para su publicación el 22 de marzo de 1977.

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, km 15.5 Carretera México-Toluca, México 10, D.F.

parte del virión. Para esta reacción es necesario la presencia de un detergente no iónico (Triton N-101), cuya función es probablemente la de eliminar la capa de lípidos del virión, permitiendo el acceso a la enzima; también se necesita la presencia de mercaptoetanol y otras sustancias en la mezcla de reacción.

Chang *et al.* (1974) demostraron la presencia de la polimerasa ARN dependiente de ARN en cinco aislamientos serológicamente diferentes de Rhabdovirus (VSV Indiana, VSV New Jersey, Cocal, Chandipura y Piry). Encontraron, además, que la transcriptasa de cada virus es capaz de sintetizar ARN *in vitro* que es complementaria al genoma vírico. Se dedujo que la actividad sintética se inicia simultáneamente en varios puntos del genoma vírico en secuencias específicas de nucleósidos 5' confirmando la observación de Stampfer, Baltimore y Huang (1969). Esto indica la existencia de algunas secuencias iniciadoras comunes y por lo tanto una posible relación entre los virus estudiados. Por lo tanto, si el genoma vírico del virus de la rabia logra aprovechar la ARN-T del VSV, es probable que se reduzca el período de latencia.

Una cuestión de interés primordial en este trabajo, en que se utilizan dos virus con características muy parecidas, es explorar la posibilidad de que la ARN-T del VSV incorporada a sistemas celulares donde el virus rábico deberá multiplicarse, determine una reducción del período de latencia de este último, a menos de 16 hs, en el caso de que la ARN-T del VSV sea utilizable para la transcripción del ARN del virus rábico.

Material y métodos

La línea celular empleada fue la 13SCI₃. Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21 obtenida de riñón de hámster lactante (MacPherson y Stoker, 1962) y adquirida del Instituto Wistar de Filadelfia, E.U.A. por el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, la clona 3 fue producida en el laboratorio de Investigación sobre Rabia Parálitica.

Para la preparación de monoestratos de células 13 SCI₃. Se sacó el medio de crecimiento que contenía la botella, se depositó 1 ml de tripsina, que se puso en contacto con las células y se esperaron unos minutos hasta que empezaron a desprenderse. En seguida se

le agregaron 5 ml de medio de mantenimiento, para neutralizar la tripsina y evitar que destruya a las células. Con una pipeta de 10 ml y una perilla de hule, se procedió a desprender las células de la pared de la botella tomando líquido con la pipeta y vaciándolo con fuerza sobre el monoestrato. Se contaron las células con un hemocitómetro para saber la cantidad por mililitro que contenía la suspensión así obtenida. Para las botellas Roux se sembraron 13 millones de células con 100 ml de medio de crecimiento, para las botellas de leche se utilizaron 3 millones de células con 15 ml de medio de crecimiento, después las botellas se incubaron en una estufa a 36C durante 72 horas.

La prueba de reducción de placas se efectuó mediante la técnica descrita previamente (Sedwick y Wiktor, 1970) modificada por Bijlenga y Hernández (1977 a y b).

Los virus que se emplearon en este estudio fueron:

- a) Virus de la estomatitis vesicular (VSV Indiana). Esta cepa fue proporcionada por la Comisión México-Americana de Prevención de la fiebre Aftosa en el pase 40 en embrión de pollo y llegó al departamento en el 2º pase en fibroblastos de embrión de pollo. Se hizo el primer pase en el laboratorio en tres monoestratos de células 13SCI₃ en botellas de Roux. Al segundo día después de la infección, apareció el efecto citopático en el 80% de las células. Se centrifugó el sobrenadante a 1 500 rpm durante 15 minutos y se congeló a -70C. Después se titularon varias muestras de cada botella mediante la prueba de placa y se seleccionaron aquellas botellas que tenían un título mayor de 10⁻⁷ DI*50/ml.
- b) Virus de la rabia (V-319). Esta cepa fue aislada de un vampiro (*Desmodus rotundus*); para el experimento se usó la cepa de trabajo (V.319), utilizada para la producción de vacuna contra el Derriengue, obtenida del Departamento de Producción de Vacunas del INIP (Bijlenga, Hernández y Mar, 1971; Bijlenga y Hernández, 1977a y b).

* DI = Dosis infectantes.

Para la preparación del lote de virus rábico, se utilizaron monoestratos de células 13SCl₃ en botellas Roux con medio BHK-21 con 10% suero, usando para la infección una dilución de 1:100 de virus. Al día siguiente de la infección, se le cambió este medio por otro de mantenimiento. A las 96 horas de la infección, cuando el monoestrato empezaba a degenerar por envejecimiento, se procedió a centrifugar por separado los medios de cultivo que contenía el virus a 1 500 rpm durante 15 minutos. Se envasó el sobrenadante en botellas de 100 ml y se tomaron 5 muestras simultáneas de cada botella para la titulación individual de cada cultivo.

Las muestras así obtenidas se conservaron en congelación a -70C. Posteriormente se titularon varias muestras de cada botella en prueba de placa, y se seleccionaron aquellas que tenían un título mayor de 10⁷/UFP. Se descongelaron y se envasaron en volúmenes de 5 ml conservándolos después en congelación a -70C. Este lote de virus rábico fue el utilizado para todo el estudio.

Para la inactivación del VSV Indiana se utilizó un inactivador rotatorio de luz ultravioleta,* proporcionado por el Departamento de Virología de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. La inclinación del aparato fue de 10° y la suspensión de virus pasó a una velocidad de 75 ml por minuto, quedando inactivado el 100% del virus. Para probar la inactivación se tituló tres veces en prueba de placa, dando un título de 0. Se envasó en volúmenes de 10 ml y se congeló a -70C la suspensión de virus inactivado. Este lote de VSV-UV fue el empleado para todo el estudio.

Para la infección de las células se prepararon 6 monoestratos de la línea 13SCl₃ en botellas Roux. Se procedió a sacar el medio de crecimiento, se lavaron con 10 ml de solución salina fosfatada (SSF). Dos botellas se preinfectaron con 10 ml de la suspensión de VSV-UV cepa indiana, con 10% de suero y 100 µg de DEAE Dextran por ml (Kaplan *et al.*, 1967). A las 4 botellas restantes se les puso medio de cultivo con 10% de suero y dextran únicamente. Se incubaron a 36 C durante una hora. Después de transcurrido este lapso, a las 6 botellas se les retiró el sobrenadante y se lavaron con SSF; se dejaron repo-

* J.J. Dill Co. Michigan, E.U.A.

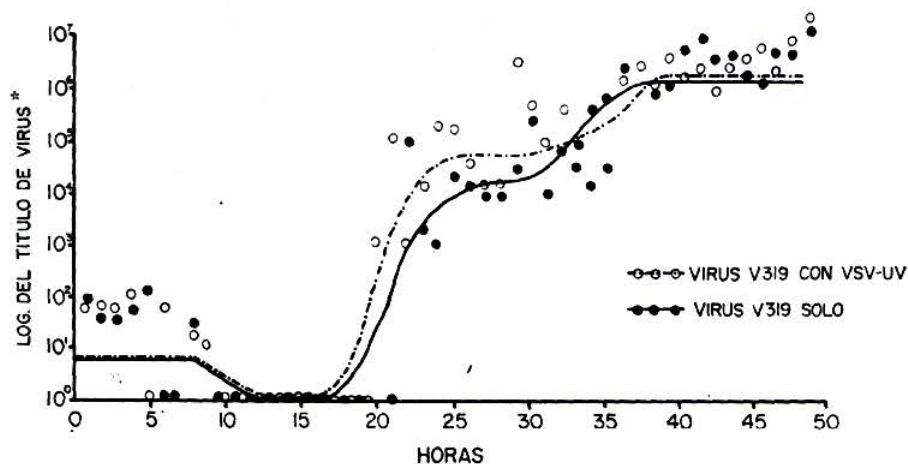
sar durante 2 hs a 33C con 15 ml de medio de mantenimiento y se procedió a sacar el sobrenadante de las botellas y a las 2 botellas con VSV Indiana y a otras 2 no infectadas, se les infectó con una dilución de virus rábico V-319 en dilución 1:100, las 2 botellas restantes se usaron como testigos, añadiéndoles solamente medio para infección. Se incubaron nuevamente las 6 botellas a 36C durante una hora y se les sacó el sobrenadante, lavándose nuevamente con SSF. Después cada botella recibió 100 ml de medio de mantenimiento. Se incubaron a 33C y desde este momento empezó a contar el tiempo. Se hicieron muestreos cada hora, hasta obtener muestras durante 48 horas, y por ese motivo hubo que repetir varias veces la prueba. El muestreo consistió en sacar 5 ml de cada botella y envasarlos en volúmenes de 1 ml conservados a -70C para su posterior titulación. Después de cada muestreo se reemplazaron los 5 ml de muestra con otros 5 ml de medio de mantenimiento.

Después de las 48 horas, se dejaron las botellas en la estufa a 33C observándolas cada 12 hs. A las 63 horas después de la infección, se presentó el efecto de envejecimiento del 30% del monoestrato. Se sacó el medio, se centrifugó a 1 500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se guardó a -70C para su posterior estudio. Se titularon las 48 muestras en prueba de placa (Sedwick y Wiktor, 1970), con diluciones de 10⁻⁰ a 10⁻⁸. Las muestras recolectadas a las 63 horas se titularon en presencia de un volumen igual de una dilución constante de suero hiperinmune antirrábico y con suero fetal bovino como control. Esto se hizo para tener la seguridad de que lo que había crecido era virus rábico y no virus VSV o algún mutante.

Resultados

En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos en el experimento con virus V-319 con ARN-T, la curva de producción de virus rebasa la línea del título de 10⁻² a las 19 hs, o sea donde ya se puede decir que hay producción del virus, pues abajo de este título los resultados pueden ser oscurecidos por virus residual que eluye de las células infectadas. Mientras que en el experimento con virus V-319 sin ARN-T, la producción de virus rebasa la línea del título de 10⁻² a las

GRAFICA I



* Expresado en unidades formadoras de placa por mililitro.
) Los puntos claros y oscuros expresan los valores observados y las curvas representan valores promedio.

21 hs. Esta elevación del título se consideró como el final del período de latencia. Esta gráfica también indica que donde hubo una diferencia significativa en la producción de virus, fue en el período comprendido entre las 17 a las 27 hs. Para calcular la diferencia de la constante de producción de virus (K), de los dos experimentos, se usó la siguiente fórmula (Stevens y Groman 1963; Hernández, 1964).

$$K = \frac{2.3 \log. \frac{V_0}{V}}{(C) (T)}$$

Donde:

- K = Constante de producción de virus
- V_0 = 0 U.F.P. al iniciar la infección
- V = Virus libre al completarse el primer ciclo
- C = Concentración de células infectadas
- T = Tiempo en minutos al completarse el primer ciclo.

En el cuadro 1 se muestra la diferencia de las constantes de producción de Virus V-319 con y sin ARN-T, de los experimentos de la gráfica 1, donde se encontró que en experi-

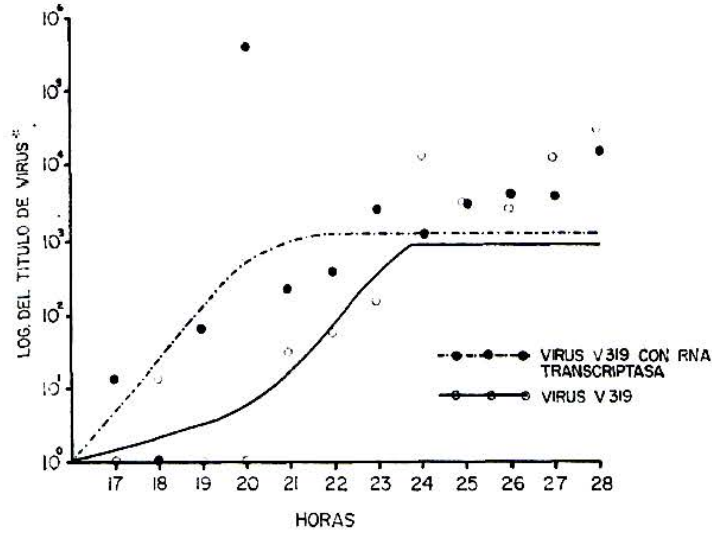
CUADRO 1

Diferencias de las constantes de producción de virus V-319 con y sin ARN-T del primer experimento

VIRUS	V_0	V	C	T	K
V-319 + ARN-T	0	10^{-2}	4 750 000	1 155	8.3×10^{-10}
V-319	0	10^{-2}	4 750 000	1 260	7.6×10^{-10}

GRAFICA 2

PERIODO COMPRENDIDO ENTRE LAS 17 Y LAS 30 Hs.



* Expresado en unidades formadoras de placa por mililitro.
Los puntos claros y oscuros expresan los valores observados y los curvas representan valores promedio.

mento de V-319 con ARN-T supera al experimento V-319 sin ARN-T, por una diferencia en la constante de producción de 0.7×10^{-10} .

En la gráfica 2 pueden verse los resultados obtenidos en el segundo experimento, donde sólo se mostró el período comprendido entre las 17 a las 27 hs. En esta gráfica se nota también que el período de latencia del virus es más corto para el experimento de V-319 con ARN-T, pues termina a las 19 hs mientras que para el V-319 sin ARN-T la producción de virus empieza a las 22 hs (fin del período de latencia).

En el cuadro 2 se muestra la diferencia de la constante de producción de virus V-319 con y sin ARN-T de los experimentos de la gráfica 2. En ella se encontró que la constante de producción de virus es mayor en V-319 con ARN-T por 1.2×10^{-10} que en V-319 sin ARN-T.

El resultado de la prueba de virus-neutralización de las muestras a las 63 hs tituladas en presencia de un volumen igual de una dilución constante de suero hiperinmune y con suero fetal bovino como control, fueron: Para

CUADRO 2

Diferencias de las constantes de producción de virus V-319 con y sin ARN-T del segundo experimento

VIRUS	V ₀	V	C	T	K
V-319 + ARN-T	0	10^{-2}	4 750 000	1 148	8.4×10^{-10}
V-319	0	10^{-2}	4 750 000	1 330	7.2×10^{-10}

el virus con suero hiperinmune, el título fue de cero U.F.P./ml.

Para el virus con suero fetal bovino, el título fue de 2.0×10^{-5} U.F.P./ml lo cual indica que el virus detectado mediante la prueba de placas fue efectivamente virus rábico.

Discusión

Tanto el virus de la estomatitis vesicular como el virus de la rabia forman partículas en forma de bala (B) y truncadas (T) (Huang, Greenwalt y Wagner, 1960). La función biológica de las partículas T es de interferencia homóloga (Huang, Baltimore y Stampfer, 1970; Huang, Greenwalt y Wagner, 1960; Huang y Wagner, 1966). Esta interferencia no es una simple competencia por sitios receptores en la membrana celular, ya que Sreevalsan (1970) pudo demostrar plena actividad de interferencia cuando infectó células de ovario de hámster chino con partículas B purificadas y reinfectó con partículas T purificadas. Este mismo autor observó la presencia de interferencia homóloga en grado máximo aún retrasando la superinfección de T hasta por una hora. Por otra parte se ha observado que se requiere del ARN completo en las partículas T, pues las partículas T irradiadas con luz ultravioleta no muestran actividad inhibitoria. Sreevalsan (1970) considera que el efecto inhibitorio del VSV por las partículas T es ejercido a nivel de competencia intracitoplástica por la transcriptasa ARN dependiente del ARN (ARN transcriptasa); obviamente esta competencia sólo puede tener lugar cuando el ARN de las partículas T se encuentra completo, ya que si está dividido en fragmentos demasiado pequeños, éstos serán simplemente metabolizados por la célula.

La actividad de ARN transcriptasa está íntimamente asociada con el virión de VSV (Baltimore, Huang y Stampfer, 1970) y por lo tanto se considera como parte constitutiva del mismo. El requisito de que en el medio de reacción se incluya un detergente no iónico como el triton N-101, sugiere que la enzima se encuentra íntimamente asociada al ARN vírico y que es necesario desagregar la envoltura viral a fin de exponer la enzima y detectar su actividad.

El virus de la rabia carece de actividad de ARN transcriptasa (Koprowski, comunica-

ción personal). Entre otras diferencias en su modo de acción, el VSV causa una citolisis rápida (en dos o tres días) en la mayoría de las células del monoestrato infectado, en tanto que el virus de la rabia causa citolisis esporádica de cinco a siete días después de la infección (Hernández, 1972).

En el trabajo aquí presentado se usó virus de VSV cepa Indiana. Esta cepa de VSV es la más abundante en ARN transcriptasa (Chang *et al.*, 1974); si bien esta actividad es solamente detectable en las partículas B. La ARN transcriptasa del VSV, por otra parte, es capaz de iniciar la síntesis de ARN *in vitro* con una serie de virus del mismo grupo (Chang *et al.*, 1974). Esto sirve de confirmación de la estrecha relación taxonómica de estos virus entre sí.

Se utilizó VSV inactivado con luz ultravioleta como fuente de ARN transcriptasa a fin de observar si podía reducirse la fase de eclipse del virus rábico por la acción de la ARN transcriptasa. En la gráfica 1 se advierte la diferencia observada. Cabe hacer notar que la fase de eclipse del virus rábico solo (cepa V-319) no fue de 16 hs como se ha informado en la literatura para la cepa Flury avianizada (Kaplan *et al.*, 1967). Esto bien puede deberse a que se usó una multiplicidad virus/célula baja (2:1) a diferencia de la alta multiplicidad empleada por Kaplan *et al.* (1967). La razón para usar multiplicidad baja en la infección fue que se trató de eliminar la actividad de autointerferencia de las partículas T del virus de rabia mediante la dilución (Huang y Wagner, 1966). Bajo estas condiciones se observó que el período de latencia fue de 21-22 horas cuando se empleó virus rábico solo y de 19 horas cuando se preinfectó con VSV inactivado. Con ninguno de los dos virus se efectuó la separación de partículas T y B por el riesgo de formar aerosoles con el virus de la rabia. Las partículas T del VSV no ejercieron una interferencia homóloga por estar inactivados con luz ultravioleta; sin embargo, actuaron como un factor de dilución de las partículas B y por lo tanto de la ARN-T.

Si bien no se observó una reducción de 10 horas en el período de latencia, sí se obtuvo una reducción de dos horas en la primer serie de experimentos. Cuando se repitió la serie de experimentos examinando el tiempo crítico (entre las 17 y las 27 horas), se en-

contró un acortamiento de tres horas en el período de latencia. Cuando se usó el virus de rabia solo, se observó producción de virus de progenie a las 21-22 horas, y cuando se preinfectó con VSV inactivado, la producción de virus de progenie ocurrió a las 19 horas.

Si bien se observó una reducción en el tiempo de aparición del virus de progenie, cabría la duda de si este virus de progenie es realmente virus de rabia o si el virus de rabia reactivó al VSV en una forma análoga a lo ocurrido con los virus de la viruela (Joklik, 1964), o bien si se trata de una mutación. El comportamiento de virus de progenie es, con base en pruebas de virusneutralización, similar al del virus rábico y es completamente neutralizado por anticuerpos específicos contra la rabia, lo cual, desde el punto de vista inmunológico, elimina la posibilidad de que se trate de VSV o de una recombinación de VSV y rabia.

Si bien una reducción de dos o tres horas en la fase de eclipse no resulta de utilidad práctica para una producción de vacuna, es sorprendente que se haya obtenido un efecto reproducible como el observado, sobre todo teniendo en cuenta que ambos virus han sido clasificados recientemente en dos géneros distintos; los vesiculovirus y los lyssavirus (Fenner, 1976).

Los resultados que aquí se discuten sugerirían que la relación taxonómica del virus de la rabia con otros virus del género *Rhabdoviridae* es más estrecha de lo que se imaginaba en caso de que la ARN-T realmente esté ayudando al virus rábico. Una explicación del efecto observado sería, entonces, que la enzima del VSV copiara el ARN del virus rábico; lo cual indicaría que los codones en que se inicia la transcripción son idénticos a los del VSV y por lo tanto, comunes a los virus del género *Rhabdoviridae* hasta hoy estudiados (Chang *et al.*, 1974; Stampfer,

Baltimore y Huang, 1969). Otra posibilidad sería que las propiedades de la membrana celular hubieran sido alteradas por el pretratamiento de VSV-UV y por lo tanto se redujera el período de latencia del virus rábico. Las condiciones en que fue efectuada esta serie de pruebas no permite por el momento distinguir entre estas posibilidades.

Cabe hacer notar que si bien los cultivos pretratados con VSV-UV tuvieron un período de latencia más corto, la producción máxima de virus a las 50 horas fue igual a la de los cultivos testigos (gráfica 1), lo cual indica que aun cuando la producción de virus se inicia antes, la cosecha final de virus no aumenta.

Summary

Four series of Roux bottles were used in the following treatments: 1. Control batch, without virus. 2. Inactivated VSV virus only. 3. Rabies virus only, and 4. Preinfection with VSV-UV followed by rabies virus. Samples of all bottles were taken hourly for 48 hours and the virus content of the samples were titrated by the plaque test in agarose suspensions. The virus obtained in treatment 4 was treated with monospecific antirabies serum and was completely neutralized by it. The virus production constant for rabies virus in treatments three and four were: $K = 7.2 \times 10^{-10}$ and $K = 8.4 \times 10^{-10}$ respectively. On the average of the tests, the latency period of rabies virus was reduced in 2.5 hours \pm 30 minutes, compared to the values observed for rabies virus alone. In view of the results obtained, it is likely that the replicase activity of VSV has been used by rabies virus. These preliminary results do not justify the addition of VSV-UV to tissue cultures for rabies virus production not only for the slight effect observed but also for the danger of including a defective RNA of a different virus to the one being produced.

Literatura citada

- ANDREWES, C. and H.G. PEREIRA, 1972, Viruses of Vertebrates, 3^a Ed., Balliere, Tindall y Cook The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BALTIMORE, D., A.S. HUANG and M. STAMPFER, 1970, Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. 11. An RNA polymerase in the virion, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, N^o 2, 66:572,576.
- BIJLENGA, G. and E. HERNÁNDEZ, 1977a, Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), *Br. Vet. J.* In press.
- BIJLENGA, G. and E. HERNÁNDEZ, 1977b, Testing of the vaccine potencial of the plaque purified rabies virus strain V-319, derived from a vampire bat

- (*Desmodus rotundus*) in México, *Br. Vet. J.*, In press.
- BIJLENGA, G., E. HERNÁNDEZ, y R. MAR, 1971, Vacunación experimental en ganado con una cepa de rabia de origen murciélago vampiro elaborada en cultivo celular, *VIII Reunión Anual, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías, México*.
- CHANG, S., H.E. HEFTI, J.F. OBIJESKI and D.H.L. BISHOP, 1974, RNA transcription by the virion polymerases of five rhabdovirus, *J. Virol.*, 13:652-661.
- FENNER, F., 1976, The classification and nomenclature of viruses, Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Madrid, September, 1975. *Virology*, 71:371-378.
- HERNÁNDEZ, B.E., 1964, Adsorption of infectious bovine rhinotracheitis virus to bovine leukocytes. *M. S. dissertation at U. of Calif., Davis, Calif.*
- HERNÁNDEZ, B.E., 1972, Comparative electron microscope studies of the virus cell interactions associated with several tissue culture adapted strains of rabies virus, *Ph. D. dissertation at U. of Calif., Davis, Calif.*
- HUANG, A.S., D. BALTIMORE and M. STAMPFER, 1970, Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. III. multiple complementary messenger RNA molecules. *J. Virol.*, 42:946-957.
- HUANG, A.S., J.W. GREENWALT and R.R. WAGNER, 1960, Defective T particles of vesicular stomatitis virus. I. preparation, morphology and some biologic properties, *Virology*, 30:161-172.
- HUANG, A.S. and R.R. WAGNER, 1966, Comparative sedimentation coefficients of RNA extracted from plaque-forming and defective particles of vesicular stomatitis virus, *J. Mol. Bio.*, 22:381-384.
- JOKLIK, W.K., 1964, The intracellular uncoating of pox virus DNA. 11. The molecular basis of the uncoating process, *J. Mol. Bio.*, 8:277-288.
- KAPLAN, M.H., T.J. WIKTOR, R.F. MAES, J.B. CAMPBELL and H. KOPROWSKI, 1967, Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: construction of a single cycle growth curve, *J. Virol.*, 1:145-151.
- MACPHERSON and M. STOKER, 1962, Polyoma transformation of hamster cell clones and investigation of genetic factors affecting cell competence, *Virology*, 16:145-151.
- SEDWICK, W.D. and J.D. WIKTOR, 1970, Reproducible plaquing system for rabies, Lymphocytic Choriomeningitis and other RNA viruses, in BHK-21/13S agarose suspensions, *J. Virol.*, 1:133-142.
- SREEVALSAN, T., 1970, Homologous viral interference: Induction by RNA from defective particles of vesicular stomatitis virus, *Science*, 169:991-992.
- STAMPFER, M., D. BALTIMORE and A.S. HUANG, 1969, Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. 11. Species of ribonucleic acid found in chinese hamster ovary cells infected with plaque-forming and defective particles, *J. Virol.*, 4:154-161.
- STEVENS, J.G. and GROMAN, N.V., 1963, Properties of infectious bovine rhinotracheitis virus in a quantitated-virus-cell culture system. *Am. J. vet. Res.*, 24:1158-1163.