



Histórica del trasplante de córneas y los medios para su preservación

José Gutiérrez Salinas,* Maricela Castillo Vázquez,** Jorge Galicia Carreón,*** Jorge Galicia Tapia****

RESUMEN

En la historia del trasplante de córnea sobresalen los nombres de Peltier, Muhlabauer y Fuchs, entre otros. A partir de 1905 Eduard Konrad Zirm consolida el método que hoy es la base de millones de cirugías oculares que se realizan en todo el mundo y surge una nueva era para la medicina: la de los trasplantes. En 1944 Paton funda en Estados Unidos el primer banco de ojos de donador postmortem. A partir de 1950 surge la microcirugía y la técnica "de punch" de Vannas, misma que permitió obtener tejido de córnea prácticamente intacto. En el decenio de 1970 Stocker propuso el papel que juega el endotelio corneal en el mantenimiento de la claridad de la córnea. Para la conservación del tejido se desarrollaron dos métodos: almacenamiento hipotérmico y medios de cultivo de órganos (M-K, K-sol, Dexsol). En la actualidad, el trasplante de córnea es homólogo y existen dos técnicas quirúrgicas: el trasplante laminar y el trasplante perforante, con las que se evita el edema de la córnea cuando ésta se sumerge en un medio con dextran. La evaluación de las células epiteliales se realiza con un microscopio especular. Como consecuencia del progreso en la manipulación génica surgió la posibilidad de desarrollar un sistema de inyección de genes a la córnea para bloquear los que contienen histocompatibilidad HLA del receptor y evitar así el rechazo; esto ha favorecido a los receptores del trasplante.

Palabras clave: trasplante de córnea, medios de cultivo, medios de preservación de córneas.

ABSTRACT

In the history of corneal transplant we can mention names such as Peltier, Muhlabauer, and Fuchs, but it wasn't until 1905 with Dr. Eduard Konrad Zirm that a new method was consolidated. This method, which is the current base of millions of eye surgery, worldwide gave rise to a new medical era, the era of transplants. With the use of post-mortem donor tissue, Dr. Paton in 1944 created the first eye bank in the USA. In 1950, Dr. Vannas' punch technique and microsurgery allowed the removal of intact corneal tissue. In the 1970 decade Dr. Stocker talked about the role that corneal endothelium plays in the maintenance of corneal clarity. Because of this, two methods were created for the tissue preservation: hypothermic storage and organ preservation media (M-K, K-sol, Dexsol). Currently, the corneal transplant is homologous, and there are two surgical techniques: the laminar transplant and the total transplant; the corneal edema is avoided when the cornea is immersed in a media with Dextran. The evaluation of the epithelial cells is performed with a specular microscope. With the advance in genetic manipulation, the possibility of developing a gene injection system to the cornea so the recipient's hystocompatibility genes HLA be blocked and the rejection doesn't take place is arising, this fact would be in favor of the transplant recipients.

Key words: corneal transplant, culture media, corneal preservation media.

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

** Alumna de Internado, Escuela de Medicina Santiago Ramón y Cajal, Universidad Westhill.

*** Alumno del cuarto grado de la carrera de médico cirujano, Facultad de Medicina, UNAM.

**** Departamento de Investigación, Subdirección General Médica, ISSSTE.

Correspondencia: Dr. José Gutiérrez Salinas. Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. San Lorenzo núm. 502, 2º piso, colonia Del Valle, CP 03100, México DF. E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com.
Recibido: abril, 2005. Aceptado: agosto, 2005.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

Es un hecho conocido que Goethe padeció varicela que, como secuela, le dejó el rostro marcado con cicatrices. En su época muchas personas quedaban ciegas a consecuencia de las cicatrices en la córnea: no había tratamientos capaces de curarlos. Este no fue el caso de Goethe; sin embargo, de haber existido el trasplante de córnea hubiera sido la elección terapéutica para él y otros que quedaban ciegos debido a esta y otras enfermedades que opacan o alteran la córnea.

En 1905 Eduard Konrad Zirm (figura 1A), jefe de Medicina del Hospital de Olomouc, hoy Moravia en la República Checa, efectuó con éxito el primer trasplante de órgano en un ser humano (figura 1B). Trasplantó

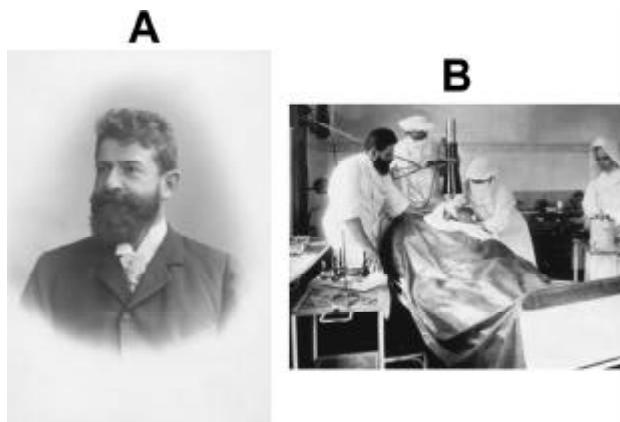


Figura 1. A. Eduard Konrad Zirm, precursor del desarrollo de las cirugías de trasplante de córneas. B. Momento en que Zirm realiza la primera cirugía de trasplante de córnea en un sujeto que quedó ciego a consecuencia de un accidente laboral (Referencia 10).

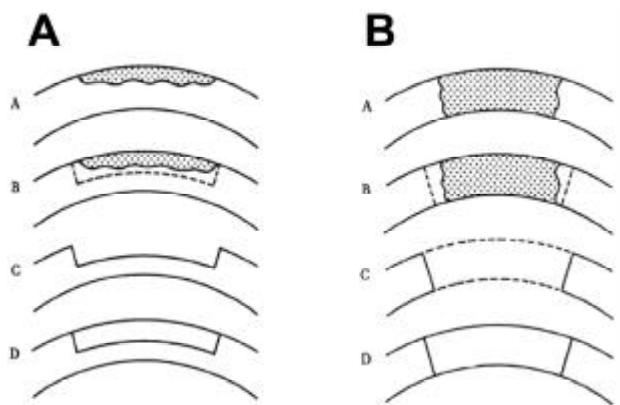


Figura 2 Se describen los pasos efectuados en un trasplante de córnea de tipo laminar (A) y perforante o total (B). A. Córnea con una nube en la porción anterior. B. La línea punteada indica el corte que realiza el cirujano, que da como resultado la imagen de C. Para pasar de B a C se retiran las capas superficiales de la córnea (las láminas anteriores), de ahí su denominación de laminar. D: ejemplo de colocación del injerto transparente, que corresponde perfectamente al lecho preparado con anterioridad. Esta operación sólo es útil en pacientes con opacidad superficial. En caso contrario se requiere trasplante perforante o total.

la córnea de un adolescente de 11 años de edad que murió accidentalmente, al ojo de un labrador que había quedado ciego. Después del trasplante de la córnea el paciente permaneció en observación para identificar cualquier cambio, como la opacidad o cualquier otro signo que indicara deterioro de la misma. Al cabo de algunas horas el paciente recuperó la vista, misma que conservó hasta su fallecimiento. La operación y la

recuperación del paciente fueron difíciles, pues en ese tiempo no había un microscopio que facilitara el procedimiento de sutura de la córnea adecuadamente; sin embargo, la destreza quirúrgica de Zirm le permitió suturar con éxito.¹

Este acontecimiento histórico terminó con más de cien años de intentos fallidos, en el campo de la cirugía ocular en todo el mundo. El método desarrollado por Zirm es la base actual con la que en todos lados se realizan millones de cirugías oculares al año, además de sentar las bases metodológicas para efectuar trasplantes de corazón, riñón e hígado, entre otros.

Eduard Konrad Zirm fue un precursor del desarrollo de los métodos modernos de cirugía de ojos, mismos que al paso de los años se han mejorado gracias a la disponibilidad de antibióticos y corticoesteroides, que han hecho del trasplante de córnea una intervención exitosa. Esta última posibilidad incrementó la demanda de intervenciones, incluido el trasplante de córneas provenientes de donador cadavérico. En este punto fue importante el desarrollo de métodos para la conservación de las córneas provenientes de donador cadavérico; el mantenimiento de la integridad del epitelio corneal es el punto decisivo para que una córnea transplantada pueda sobrevivir en el ojo del receptor.

BREVIARIO HISTÓRICO DE LOS TRASPLANTES DE CÓRNEA

La historia de los trasplantes de córnea ha evolucionado lentamente. La recuperación, mediante la sustitución de la córnea, de la visión de uno o ambos ojos dañados por alguna enfermedad, la describió Peltier de Quengsy en 1789. Este científico precursor propuso el reemplazo de la córnea opaca por una lente convexa; las limitaciones técnicas impidieron el éxito del proyecto. En 1824 Reisinger intentó trasplantes en gallinas y conejos sin resultados satisfactorios. Los primeros trasplantes laminares los efectuaron Muhlbauer y Königshofer, por aquellas mismas fechas. Dieffenbach, en Berlín, en 1830, también lo intentó, pero sin éxito.¹

En 1844 Kissam realizó el primer trasplante heterólogo exitoso, que duró seis meses. Los sucesivos fracasos hicieron que se abandonara todo intento en lo que restó del decenio. En 1853 Nussbaum y Dimmer intentaron, sin éxito, reemplazar la córnea por cristal y

celuloide. Un progreso importante, de tipo técnico, se debe a Von Hippel, quien en 1886 inventó el trépano (cuchillo circular), que facilitó muchísimo la intervención. En 1894 Fuchs operó a 30 pacientes y consiguió éxito en 11 de ellos. A partir de 1905 los trabajos de Zirm sientan las bases para el desarrollo de esta técnica, se propuso que los trasplantes debían ser homólogos. Pasaron casi 50 años antes de que los trasplantes de córnea fueran un procedimiento rutinario. Finalmente, alrededor de 1930 Filatov utilizó con éxito córneas de cadáver. En contraste con la larga historia de intentos de trasplante de córnea está la creación de los bancos de ojos, que permaneció enclaustrada durante unas cuantas décadas.¹⁻⁴

En la primera mitad del siglo XX el tejido fresco de donador se consideró la mejor opción para un trasplante de córnea exitoso. Los ojos de los donantes se enucleaban y luego se obtenían las córneas; los ojos de los recién nacidos eran los más apreciados para este propósito. Sin embargo, en 1935, Filatov y sus colaboradores, en Ucrania, demostraron que era posible utilizar el tejido obtenido de un donador postmortem.² Este hecho sentó las bases para el uso masivo de injertos y la creación de los bancos de ojos. En 1944 Paton fundó, en Estados Unidos, el primer banco de ojos. Este hecho marcó el final de la época en que la córnea tenía que extraerse lo más pronto posible del donador cadáverico, se carecía de los registros necesarios de salud y control existentes en la actualidad. Ahora, el cirujano, el paciente, los bancos de ojos y la sociedad comparten los mismos intereses para asegurar que el tejido disponible sea tratado con las condiciones de seguridad sanitaria máximas, para asegurar lo mejor posible las ventajas para todos los involucrados.¹⁻⁴

TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Los antecedentes que hoy permiten efectuar las operaciones oculares son las diversas técnicas creadas para causar un traumatismo mínimo al injerto córneo, mediante la extracción con navajas muy filosas. Durante el siglo XIX fue práctica común la trepanación del ojo con instrumentos de doble hoja de corte, con la que se obtenía un injerto de forma cuadrada. En los primeros días de la cirugía ocular la sutura del injerto corneal era muy difícil, pues no se disponía de microscopio ni

instrumental quirúrgico adecuados. La sutura era muy gruesa y los instrumentos quirúrgicos muy grandes y toscos. La introducción de la microcirugía, a partir de 1950, junto con el desarrollo del microscopio y de instrumentos quirúrgicos muy finos, permitieron controlar y efectuar cada paso del trasplante de córnea, que se realizaba con control visual directo. Ahora se sabe que el epitelio de la córnea no debe tocarse ni dañarse durante el proceso de extracción, ni durante su trasplante. Así, la técnica de "punch", introducida por Vannas, en Escandinavia, permitió obtener el injerto córneo prácticamente sin daño alguno. A su vez, el desarrollo de la microcirugía permitió el uso de suturas muy delgadas (10 a 11 ceros) que hoy en día hacen que el trasplante de injertos de córnea sea una intervención quirúrgica de rutina en los hospitales especializados.

Desde el punto de vista quirúrgico, la córnea puede sustituirse, por lo menos, mediante dos recursos por completo distintos. El primero, como en el caso del cristalino artificial, consiste en utilizar cualquier material con propiedades semejantes a la córnea: implante o prótesis. El segundo utiliza la misma estructura obtenida de otros seres vivos: injerto o trasplante. En este último caso existen tres opciones: 1) trasplante proveniente de una especie animal distinta (heterólogo); 2) de la misma especie (homólogo) y 3) proveniente del mismo individuo (autólogo). Si la córnea se reemplaza por una lente de vidrio será un implante. Si la córnea humana dañada se reemplaza por una de un animal cualquiera será un trasplante heterólogo. Si la córnea proviene de otro humano se tratará de un trasplante homólogo y si la córnea proviene del mismo individuo (por ejemplo de su otro ojo) será un trasplante autólogo. Se conocen por lo menos dos técnicas para realizar el trasplante de córnea: laminar y perforante o total.

En la figura 2A se ilustran los pasos de un trasplante laminar de córnea y en la 2B el proceso de un trasplante de córnea perforante o total.

SISTEMAS DE PRESERVACIÓN DE CÓRNEAS

En el decenio de 1970 Stocker demostró el papel del endotelio de la córnea en el mantenimiento de su claridad.³ Durante aquellos años se desarrollaron dos métodos para la conservación de estos tejidos: a) alma-

cenamiento hipotérmico y b) preservación con medio de cultivo de órganos.^{4,7}

El desarrollo de las técnicas de almacenamiento hipotérmico, y la determinación del tiempo de éste para la preservación de las córneas, es un gran progreso en el trasplante de córneas. En condiciones de hipotermia la córnea se almacena a 4°C sumergida en un medio complementado con antibióticos y agentes deshidratantes (dextran y sulfato de condroitina) que favorecen la preservación de la tonicidad de la córnea. Los medios M-K, K-Sol, Dexsol y Likorol permiten la conservación exitosa de la córnea durante más de cuatro días. También se han utilizado medios de cultivo complementados con suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos. En este caso, la córnea se preserva a temperaturas de 30-37°C.

El hinchamiento que sufre la córnea en este tipo de medios carentes de agentes deshidratantes es reversible, aunque sólo por corto tiempo, que es el que se supone trascurre mientras se realiza el trasplante. En la actualidad, el hinchamiento de la córnea a trasplantar se revierte cuando ésta se sumerge durante unas horas en un medio con dextran y a temperatura ambiente. La integridad del endotelio de la córnea es mejor cuando ésta se coloca en un medio de cultivo de tejidos a 37°C, que permite la supervivencia incluso por cinco semanas; mucho más de los cinco días que puede durar el tejido de la córnea almacenado en condiciones hipotérmicas. El almacenamiento en estas últimas condiciones es una práctica común en la mayor parte de los bancos de ojos en todo el mundo, debido a su menor costo.⁸⁻¹¹

En todas partes la supervivencia de un injerto es motivo de controversia entre los cirujanos y clínicos debido a la existencia de las dos formas de conservación del trasplante. En Estados Unidos prefieren la preservación hipotérmica, con almacenamiento hasta de ocho días. En casi todos los países europeos prefieren los medios de cultivo a 37°C, con mayor tiempo de almacenamiento del tejido. Se han evaluado ambas formas de almacenamiento (1 a 2 años postrasplante) y encontrado con resultados similares en cuanto a capacidad visual, grosor de la córnea y densidad de las células epiteliales.^{12,13}

La evaluación del epitelio de la córnea antes, durante y después de su preservación en un medio

propicio es decisiva para determinar el éxito del trasplante. La pérdida de células endoteliales de la córnea mientras está almacenada en un medio de preservación es variable, depende del medio utilizado y la temperatura a la que se almacena.¹⁴⁻¹⁹ En general, puede afirmarse que los injertos de córnea no toleran mucho tiempo de almacenamiento debido a la pérdida significativa de células endoteliales. El epitelio de la córnea se pierde mucho más rápido durante su almacenamiento, cuando el tejido proviene de algún donante que padeció infección por virus del herpes. Está reportado que los medios de preservación de córneas, en condiciones hipotérmicas, conservan la integridad del epitelio sólo durante cinco días como máximo, en lugar de los 16 días que sugieren los fabricantes.

Para asegurar que el tejido a trasplantar se encuentra en las mejores condiciones, independientemente del método y tipo de medio para preservarlo, es necesario un estricto control de calidad mediante la inspección rutinaria del epitelio durante el tiempo que permanezca almacenado. Factores como el tiempo postmorten de obtención del injerto, las causas de la muerte del donador y sus circunstancias, la edad del donante, etc., pueden afectar la calidad del epitelio de la córnea y con ello aumentar la muerte de las células durante su almacenamiento.^{20,21,22}

Las técnicas utilizadas para evaluar la integridad de las células epiteliales en los injertos de córneas almacenadas en los distintos medios incluyen: la tinción de las mismas con azul de trypan y colocar el tejido en una solución hipotónica para observar el grado de hinchamiento de los bordes intercelulares. La prueba de tinción con azul de trypan puede reemplazarse mediante la observación de las células epiteliales por medio de un microscopio que permita el contraste de fases. Esta técnica es particularmente útil para inspeccionar los epitelios de injertos preservados durante largos períodos debido a que permite inspeccionar el grosor del injerto de la córnea. De esta manera pueden detectarse oportunamente los cambios en el injerto corneal y evitar fallas posteriores en el trasplante. Así, variables como la edad del donador y otras más pueden descartarse para asegurar la mayor disponibilidad de córneas para trasplante. La claridad y grosor del tejido corneal mantenido *in vitro* dependen, principalmente, de la cantidad de agentes deshidratantes

presentes en el medio, el tiempo transcurrido desde la muerte del donante hasta su almacenamiento final, así como el tiempo que pase antes de que sea trasplantada la córnea. Para la observación directa de los cambios en las células del epitelio corneal se cuenta con la técnica de observación a través del microscopio especular.

La observación del epitelio corneal en injertos preservados en medios bajo condiciones hipotérmicas se efectúa, rutinariamente, a través del microscopio especular. Es así como ha sido posible la utilización de córneas provenientes de sujetos incluso de 70 años de edad, cuyos tejidos conservaron intactas sus características morfológicas durante el tiempo que se preservaron en medios en condiciones hipotérmicas y que podrían descartarse debido a la edad del donante.²³

Para asegurar un buen trasplante es necesario que el epitelio de la córnea del donante no esté dañado o se rasgue durante su extracción; además, se requiere que en el epitelio haya una densidad celular mínima de 2000-2500 células/mm². Esta cifra tiene su razón de ser ya que un recién nacido tiene una densidad celular cercana a las 4,000 células/mm², que disminuye conforme va creciendo para alcanzar un promedio de 3,000 células/mm² en el adulto. Una densidad celular de 3,000 células/mm² es infrecuente en los injertos corneales, por muy frescos que estén. En la actualidad se considera que la edad del donador o el tiempo postmorten no influyen en la densidad final de las células epiteliales durante el tiempo de almacenamiento.²⁴⁻²⁹

Hoy en día se dispone de muchas otras técnicas para preservar y almacenar el tejido de la córnea, además de las que aún están en desarrollo. La criopreservación con o sin formación de cristales acuosos es una posibilidad que se está investigando y que seguramente permitirá el almacenamiento durante un tiempo considerablemente más largo de las córneas y elegir con mayor certeza al receptor más adecuado. También están en desarrollo otros sistemas y medios de cultivo de órganos, que se ven favorecidos por el progreso en la manipulación génica, que permite vislumbrar un sistema de inyección de genes a la córnea a trasplantar para que los genes de histocompatibilidad tipo HLA del receptor se bloqueeen y con ello se asure el no rechazo al injerto por bloqueo de la respuesta inmunitaria.

La manipulación génica quizá ayude a que las células endoteliales recuperen las capacidades que, por alguna razón, perdieron. En un intento por recuperar la funcionalidad de los epitelios dañados por el tiempo de preservación, durante los últimos años se ha experimentado con la introducción de nuevas células al injerto corneal, durante su preservación en un medio de cultivo.³⁰⁻³⁷

REFERENCIAS

1. Zirm E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol 1906;64:580-93.
2. Filatov VP. Transplantation of the cornea. Arch Ophthalmol 1935;13:321-47.
3. Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. Trans Am Ophthalmol Soc 1953;51:669-786.
4. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. Invest Ophthalmol Vis Sci 1974;13:165-73.
5. Bigar F, Kaufman HE, McCarey BE, Binder PS. Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in man. Am J Ophthalmol 1975;79:115-20.
6. Doughman DJ, Van Horn DL, Harris JE, Miller GE, Lindstrom RL, Good RA. The ultrastructure of human organ-cultured cornea. I Endothelium. Arch Ophthalmol 1974;92:516-23.
7. Summerlin WT, Miller GE, Harris JE, Good RA. The organ-cultured cornea: an in vitro study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1973;12:176-80.
8. Doughman DJ, Harris JE, Schmidt KM. Penetrating keratoplasty using 37°C organ-cultured cornea. Am Acad Ophthalmol Otol 1976;81:778-93.
9. Doughman DJ. Prolonged donor cornea preservation in organ culture: long-term clinical evaluation. Trans Am Ophthalmol Soc 1980;78:567-628.
10. Pels E, Schuchard Y. In: Brightbill FS, editor. Corneal surgery. 2nd ed. St Louis: Mosby, 1986;pp:93-102.
11. Bourne WM, Doughman DJ, Lindstrom RL, Kolb MJ, et al. Increased endothelial cell loss after transplantation of corneas preserved by a modified organ culture technique. Ophthalmology 1984;91:285-89.
12. Rijneveld WJ, Beekhuis H, Van Rij G, Rinkel-Van Driel B, Pels E. Clinical comparison of grafts stored in McCarey-Kaufman medium at 4°C and in corneal organ culture at 31°C. Arch Ophthalmol 1992;110:203-5.
13. Bourne WM, Doughman DJ, Lindstrom RL. Organ cultured corneal endothelium in vivo. Arch Ophthalmol 1977;95:1818-19.
14. Doughman DJ, Harris JE, Mindrup E, Lindstrom RL. Prolonged donor cornea preservation in organ culture: long-term clinical evaluation. Cornea 1982;1:7-20.
15. Anderson J, Ehlers N. Corneal transplantation using 4-week banked donor material. Long-term results. Acta Ophthalmol 1987;65:293-99.
16. Redmond RM, Armitage WJ, Whittle J, Moss SJ, Easty DL. Long-term survival of endothelium following transplantation of corneas stored by organ culture. Br J Ophthalmol 1992;76:479-81.

17. Frueh BE, Böhnke M. Corneal grafting of donor tissue preserved for longer than four weeks. *Cornea* 1994;14:463-66.
18. Völker-Dieben HJ, D'Amaro J, Kok-Van Alphen CC, Pels E. In: Brightbill FS, ed. *Corneal surgery*. 2nd ed. St Louis: Mosby, 1986;pp:102-13.
19. Böhnke M. The Hamburg system of corneal preservation. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1991;198:562-71.
20. Pels E, Van der Gaag R. HLA-A, B, C and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 1984/1985;3:231-39.
21. Sperling S. Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol* 1979;57:269-76.
22. Cleator GM, Klapper PE, Dennett C, Sullivan AL, et al. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas. *Cornea* 1994;13:294-304.
23. Saggau DD, Bourne WM. A comparison of two preservation media (CSM and Ksol) by scanning electron microscopy of preserved corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1989;107:429-32.
24. Sperling S. Endothelial cell density in donor corneas. *Acta Ophthalmol* 1980;58:278-82.
25. Böhnke M. Ein neues System zur Lagerung von Spenderhornhäuten. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1991;198:135-37.
26. Eye Bank Association of America. Statistical Report. Washington DC: Eye Bank Association of America, 1993.
27. Mattern RM, Heck HL, Cavanagh HD. The impact of tissue utilization of screening donor corneas by specular microscopy at the University of Texas Southwestern Medical Center. *Cornea* 1995;14:562-70.
28. Chu W, Dahl P, O'Neill MJ. Benefits of specular microscopy in evaluating eye donors aged 66 and older. *Cornea* 1995;14:568-70.
29. Wiffen SJ, Nelson LR, Ali AF, Bourne WM. Morphologic assessment of corneal endothelium by specular microscopy in evaluation of donor corneas for transplantation. *Cornea* 1995;14:554-61.
30. Cavanagh HD. Eye banking 1995: danger and opportunity. *Cornea* 1995;14:545-46.
31. Larsen PA, Lindstrom RL, Doughman DJ. *Torulopsis glabrata* endophthalmitis after keratoplasty with an organ-cultured cornea. *Arch Ophthalmol* 1978;96:1019-22.
32. Pardos GJ, Gallagher MA. Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1611-3.
33. Farrell PL, Fan JT, Smith RE, Trousdale MD. Donor cornea bacterial contamination. *Cornea* 1991;10:381-6.
34. Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD. Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1983;90:38-39.
35. Kniazeff AJ, Wopschall LJ, Hopps HE, Morris CS. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro* 1975;11:400-3.
36. Geier MR, Attilah AFM, Merrill CB. Characterization of *Escherichia coli* bacterial viruses in commercial sera. *In Vitro* 1975;11:55-58.
37. Ayoubi MG, Armitage WJ, Easty DL. Corneal organ-culture: effects of serum and a stabilised form of L-glutamine. *Br J Ophthalmol* 1996;80:740-4.