

PROTECCION DE RATONES ENDOGAMICOS CEPA C57 CONTRA LA RABIA POR MEDIO DE LA INMUNIDAD ADOPTIVA

ELISEO HERNÁNDEZ B.¹
HÉCTOR PÉREZ ROMERO ²
DOLORES GONZÁLEZ VEGA ²

Resumen

Se vacunaron por vía intraperitoneal cuatro lotes de 20 ratones cada uno utilizando vacuna antirrábica Acatlán - V319. El experimento se efectuó con ratones blancos cepa CD-1 y ratones negros endogámicos cepa C57, incluyendo lotes de cada cepa de ratones con cada tratamiento. Se incluyó con cada grupo de vacunados un lote de 20 ratones homólogos no vacunados, como testigos; 30 días después de la vacunación se sacrificaron los ratones de tres de los lotes vacunados, dejándose el cuarto lote de ratones como testigos vacunados. Las células esplénicas inmunes de cada ratón vacunado fueron transferidas por vía intraperitoneal a un ratón homólogo, de tal modo que se formaron tres grupos de 20 ratones receptores de células inmunes.

Los ratones receptores de células inmunes fueron desafiados por vía intramuscular a diversos tiempos de la transferencia en conjunción con un lote de testigos vacunados y un lote de testigos no vacunados. Los tiempos de desafío postrasplante fueron de un día, siete días y 12 días, respectivamente. La protección a un día fue de 0.07%, a los siete días de 25% y a los 12 días de 75%, en tanto que ninguno de los testigos no vacunados y el 81.25% de los vacunados estaban protegidos ante el desafío. La protección después del trasplante sólo ocurrió en los ratones cepa C57. La elevación de los títulos de anticuerpos fue rápida, en tanto que la instauración de la protección requirió de más de 12 días para establecer a nivel comparable a las de los testigos vacunados. Esto parece indicar que la inmunidad humoral es más importante que la inmunidad celular. También pudieran interpretarse estos resultados en el sentido de que las células inmunes trasplantadas requieran de un período de acondicionamiento y adaptación antes de recuperar su capacidad inmune, o bien que la producción local de anticuerpos en el encéfalo fuera más útil en la protección contra el desafío virulento que la producción general en toda la circulación. Sin embargo, los resultados que aquí se comunican no permiten elegir entre estas posibilidades.

La rabia es una enfermedad infecciosa del sistema nervioso central causada por un virus (Johnson, 1965). El virus rábico en cultivos celulares se comporta como un virus no citopático (Hernández *et al.*, 1976), o bien, causa un bajo nivel de citopatogenicidad celular (Hernández *et al.*, 1976), lo cual resulta un tanto sorprendente dado el alto grado de mortalidad asociado con la infección de animales de sangre caliente con este virus (Johnson, 1965). Exis-

ten en la literatura informaciones de rabia abortiva en diversas especies animales (Bell, 1975; Mar, Bijlenga y Hernández, 1971), e incluso el hombre. Los mecanismos de protección preventiva resultan particularmente interesantes, ya que es posible obtener un alto porcentaje de ratones con rabia abortiva si se inoculan primeramente por vía intracerebral con virus HEP (Bell, 1975), que es un virus no patógeno para ratones de 21 días, y si posteriormente uno o dos días después se inocula por vía intramuscular con una cepa virulenta. Los ratones muestran síntomas de rabia en el período de incubación correspondiente, pero un alto porcentaje de ellos se recuperan, mostrando importantes alteraciones clínicas en el sistema nervioso central durante la

Recibido para su publicación el 27 de julio de 1978.

¹ Profesor de Virología ENEP-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Apdo. Núm. 25.

² Programa de Investigaciones sobre Derriengue, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Km 15.5 Carretera México-Toluca.

fase de recuperación (Bell, 1975). Este tipo de observaciones ha hallado una confirmación accidental en un laboratorista que había sido vacunado y que como consecuencia de una exposición al virus rábico, mostró síntomas clínicos y después se recuperó (Vigilancia Epidemiológica, 1977). Los medios de protección antirrábica tanto para el hombre como para los animales (Baer, 1975), han sido conocidos desde hace poco menos de 100 años y han sido objetivo de numerosas modificaciones en cuanto a la calidad y pruebas de control a que se sujetan dichos productos (Baer, 1975). La disponibilidad de buenas vacunas para uso en animales hace de la rabia una enfermedad que puede prevenirse. Dado que los animales son la fuente de infección para el hombre la prevención de la rabia en éstos, reduce el riesgo humano. El estado de conocimiento, sin embargo, no es igualmente adecuado en cuanto a los mecanismos de protección. La inmunidad humoral ha sido tradicionalmente la forma de evaluar el estado de inmunidad de individuos vacunados (Arellano, Sureau y Batalla, 1971). Sin embargo, títulos de anticuerpos de 1:25 o superiores no bastan para explicar en todos los casos el comportamiento al desafío, ya que ocurre que animales sin anticuerpos detectables sobreviven (Hernández *et al.*, 1976). Una posible explicación a este fenómeno pudiera residir en la inmunidad celular, que no siempre se comporta paralelamente a la inmunidad humoral y que en general no se mide. La prueba de inmunidad adoptiva se empleó en el presente trabajo, con la idea de dilucidar un poco la patogénesis de la rabia; los mecanismos de protección del animal inmune, así como las posibilidades de obtener una inmunidad pasiva por medio de trasplante de linfocitos inmunes en ratones endogámicos.

La inmunidad adoptiva es una prueba de laboratorio que se basa en la transferencia de células inmunológicamente acondicionadas a animales cuyos antígenos tisulares sean homólogos a los del donador, ya que de otro modo habría un rechazo inmune de las células transferidas. La presencia de anticuerpos en el receptor de las células inmunes es una medida indirecta del

éxito del trasplante y el hecho de que conjuntamente con la aparición de anticuerpos exista una protección ante el desafío virulento es una prueba complementaria de que las células inmunes transferidas siguen siendo plenamente funcionales.

Material y métodos

Se utilizaron 2 cepas diferentes de ratones, los ratones suizos blancos CD-1 proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) y los ratones negros endogámicos cepa C-57 procedentes del Bioterio del Departamento de Derriengue, INIP, SARH.

Para el desafío se empleó una cepa de virus fijo de rabia CVS* obtenido originalmente del Instituto Wistar de Philadelphia. Para este trabajo se preparó un lote de virus con la técnica descrita por Dean (1966).

Se tituló el lote de CVS en ratones blancos CD-1 y negros C-57 de 6 semanas de edad por vía intramuscular, abarcando márgenes de 10^{-1} a 10^{-6} inoculando 6 ratones por dilución con 0.1 ml de inóculo, observándose diariamente durante 21 días.

La vacuna que se utilizó para este trabajo fue la V-319/Acatlán, desarrollada en el INIP (Bijlenga y Hernández, 1978 a, b) y para los propósitos de este experimento, se obtuvieron del Departamento de Producción del INIP, 100 ampollitas liofilizadas de vacuna comercial de lote 74/F con un título de $10^{7.3}$ UFP**/ml. Se determinó la dosis 80-100% inmunizante para ambas cepas de ratones, vacunándolos por vía intraperitoneal con diluciones 10^{-1} a 10^{-4} de la vacuna (200,000 UFP) y desafiándolos 30 días después con 100 DL₅₀/ratón de CVS.

Para la prueba de inmunidad adoptiva se vacunaron cuatro lotes de 40 ratones de 21 días de cada cepa.

El primer lote se conservó como testigo vacunado y fue desafiado 30 días después de la vacunación. Los otros tres lotes de ratones fueron sacrificados a los 30 días de la vacunación y se procedió a extraer asépticamente el bazo. Las células del bazo

* C.V.S. Cepa de virus de exposición.

** Unidades formadoras de placa.

fueron obtenidas en medio mínimo esencial de mantenimiento adicionado de 2% de suero. El procedimiento de extracción de linfocitos de bazo fue de acuerdo a las técnicas descritas por Wilson y Billingham (1967), se procedió a efectuar una cuenta viable y se inoculó por vía intraperitoneal la totalidad de las células obtenidas del bazo de un ratón a otro ratón de cepa homóloga, no inmunizado, de 21 días de edad. Se llamó donadores de linfocitos a los animales sacrificados y receptores a los que fueron inoculados con éstos.

Dado que cada receptor fue inoculado con el total de las células de un donador inmune, de cada lote de 20 donadores se configuró un lote de receptores (animales receptores homólogos). Al primer lote de 20 ratones receptores se le desafió un día después del trasplante de linfocitos inmunes; al segundo a los 7 días y al tercero a los 12 días de recibir los linfocitos inmunes. Todos los desafíos fueron efectuados por vía intramuscular con virus CVS con 100 DL₅₀/ratón contenidos en 0.1 ml de inóculo. Diez ratones de cada uno de los lotes receptores fueron sangrados al momento de hacer el desafío.

El suero obtenido de estos animales así

Resultados

El lote de CVS preparado para este estudio poseía un título por vía intramuscular de $10^{4.7}$ DL₅₀ o sea 5,000 dosis 50% letales para ratón. Una dilución 1:5 contenía 1,000 dosis totales por ml o sea los requeridos 100 DL₅₀ en cada 0.1 ml de inóculo. Esta fue la dosis usual de desafío utilizada en todo el estudio.

Los ratones blancos cepa CD-1 murieron en su totalidad independientemente del tiempo transcurrido entre la transferencia de linfocitos y el desafío. En el único lote de ratones de esta cepa en que se observó un 86.2% de protección fue en el lote testigo vacunado, que fue desafiado 30 días después de la vacunación y tenía su título promedio de 1:123 PRT *** de anticuerpos en su suero.

Ninguno de los lotes homólogos cepa CD-1 de receptores de linfocitos tenía títulos detectables de anticuerpos en su suero.

La dosis mínima inmunizante 80-100% de la vacuna fue determinada en 0.5 ml de la vacuna diluida 1:100, tomando la pastilla liofilizada como de 1 ml y reconstituida con 10 ml de solución salina fosfatada pH 7.2 a 4 C inmediatamente antes de la vacunación.

CUADRO 1

Resultados de la prueba de inmunidad adoptiva en ratones Cepa C 57

LOTE	Protección al desafío %	Título de S N ¹
Testigo no vacunado	0	1:10 ²
Testigo vacunado	81.25	1:123
Receptor de 12 días	75.0	1:160
Receptor de 7 días	28.0	1:389
Receptor de 1 día	0.07	1:10

¹ Resultado de sueroneutralización por reducción en placa.

² Dilución de suero que causó una reducción del 50 de las placas.

como de 10 testigos vacunados, se empleó para pruebas de sueroneutralización en reducción de placas, de acuerdo a las técnicas descritas por Atanasiu (1966), Sedwick y Wiktor (1967).

Los resultados de la prueba de inmunidad adoptiva en ratones negros C-57 se anotaron en el Cuadro 1.

*** P.R.T. Pruebas de reducción de placas.

CUADRO 2

Tiempo de sobrevivencia de los ratones Cepa-57 que murieron como consecuencia del desafío

Lote de ratones	Tiempo en horas y desviación estándar ¹
Testigo no vacunado	176 ± 101
Testigo vacunado	300 ± 126.4
Receptor de 12 días	288 ± 115.2
Receptor de 7 días	264 ± 92.2
Receptor de 1 día	192 ± 148.7

¹ No hubo diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de sobrevivencia.

En la Gráfica 1 se anotan los datos del Cuadro 1 para su mejor representación visual.

En el Cuadro 2 se anotan datos de tiempo de supervivencia en los animales que murieron como consecuencia del desafío.

Discusión

En experiencias previas Wiktor (1871, comunicación personal) trabajando con ratas parabióticas observó que si vacunaba a una de las dos ratas y luego las separaba y desafiaba, ocurría que sólo el animal vacunado estaba activamente protegido, en tanto que la pareja parabiótica no lo estaba. Wiktor parece considerar que los anticuerpos requieren de un período de 10 días para "fijarse" al encéfalo y, por lo tanto, juegan un papel más importante que la inmunidad celular. Considera que las células del bazo son poco importantes ya que la esplenectomía no tiene influencia en los resultados del desafío. Además, no fue capaz de transferir la inmunidad de una rata vacunada a una receptora con células del bazo.

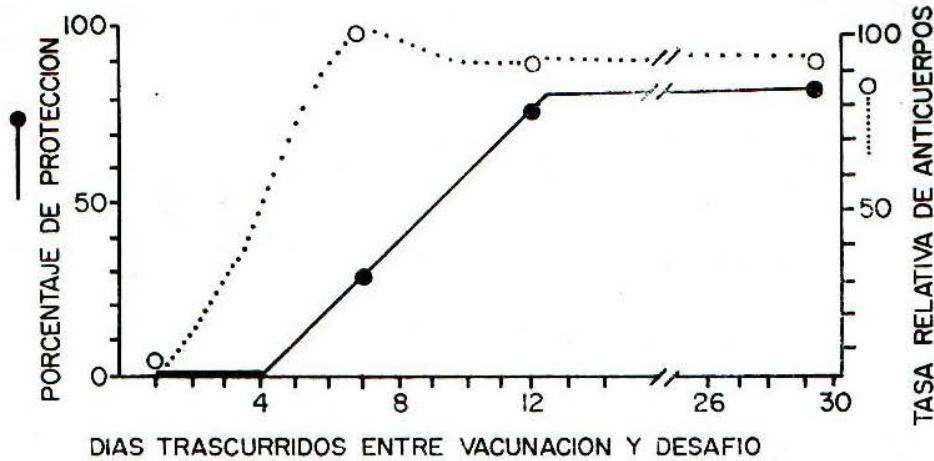
Los ratones cepa CD-1, siendo heterogéneos desde el punto de vista de sus antígenos tisulares, no recibieron el trasplante de células inmunes, por lo cual no se observó producción de anticuerpos ni protección como consecuencia del trasplante. Los ratones cepa C-57, por el contrario, tratándose precisamente de una cepa de ratones con antígenos tisulares homólogos, sí aceptaron el trasplante de células inmunes.

La prueba que aquí se comunica sirve como confirmación de la condición de los antígenos tisulares de las dos cepas de ratones empleados en el estudio. Dado que los ratones cepa CD-1 sólo se incluyeron como testigo de la cepa C-57, el resto de la discusión se limitará a los resultados obtenidos con esta última.

Puede notarse en el Cuadro 2 que los tiempos de supervivencia de los ratones no fueron alterados por las diversas manipulaciones a que se sujetaron los lotes de ratones; es decir, no hubo tendencia a crear las condiciones favorables para la presentación de rabia abortiva. En caso de que la inmunidad celular fuera importante en la protección activa de los animales, el trasplante de células inmunes esplénicas (formadas con células plasmáticas así como por una mezcla de linfocitos T y B) debería haber establecido inmediatamente un nivel de protección comparable al de los ratones inmunes.

Sin embargo, como puede verse en el Cuadro 1 y la Gráfica 1, éste no es el caso; la protección es nula un día después del trasplante. La protección parece, con el limitado número de observaciones de este estudio, iniciarse a los cuatro días del trasplante (Gráfica 1) para estabilizarse alrededor de los 13 días en el máximo observado. Deberá recordarse que esto no es un caso de inmunidad primaria sino un caso de inmunidad adoptiva, es decir, el comportamiento de células inmunes en un receptor virgen. El hecho de que los animales

Gráfica 1
**RESULTADOS DE LA INMUNIDAD ADOPTIVA
 EN RATONES CEPA C 57**



receptores no hayan permitido una elevación más rápida del nivel de protección, podría ser causado por la lenta penetración de los linfocitos de la cavidad peritoneal al sistema linfático así como por el hecho de que el sistema inmunitario de los receptores se hallaba intacto, es decir, que no se hallaban inmuno deprimidos y, por lo tanto, el sistema linfático receptor se encontraba en nivel cercano al máximo de población, con poco espacio adicional para permitir una mayor proliferación de linfocitos inmunes (F. Dixon, comunicación personal).

La rápida elevación de la tasa de anticuerpos sigue una curva completamente diferente a la de protección. En este caso sí se observa una rápida elevación de los títulos de anticuerpos. Aquí resulta más evidente que en otros casos, el hecho de que el título de anticuerpos circulantes producidos activamente por las células trasplantadas necesitan alcanzar un nivel mínimo en sistema nervioso central para ser útiles en la protección antirrábica. Nótese, por ejemplo (Gráfica 1), que los ratones que

recibieron las células inmunes siete días antes, no tenían más que un 25% de protección en tanto que su título de anticuerpos circulantes fue el más alto de los observados.

Este título de anticuerpos, desde luego no fue estadísticamente diferente de los observados en los otros animales inmunizados, pero sí indica que hay un lapso de seis días entre el tiempo en que se llega al máximo nivel de anticuerpos y se establece el máximo de protección compatible con las condiciones del experimento.

Existe una aparente discrepancia entre nuestros resultados y los de Wiktor (1971) en el sentido de que no pudo observar transferencia de inmunidad por medio del trasplante de células esplénicas.

Desafortunadamente las dos pruebas no son directamente comparables dado que Wiktor (1971) no especifica ni la vacuna empleada, ni el tiempo transcurrido después de la vacunación antes de colectar el bazo ni el tiempo transcurrido después del trasplante.

Si Wiktor (1971) trabajó bajo la suposición de que la inmunidad adoptiva debe

ría establecer de inmediato un alto nivel de protección, sus resultados serían comparables a los nuestros en el lote de receptores de un día.

Wiktor (1971) considera que sus resultados con ratas parabióticas significan que se requiere de un lapso de varios días para que los anticuerpos circulantes se fijen a los tejidos del parabionte no vacunado para establecer en él la protección.

Los resultados que aquí se comunican también permiten observar este período de varios días entre la presencia de anticuerpos y el establecimiento de la protección (período de incubación de protección), sin embargo, pudiera tener una explicación diferente a la ofrecida por Wiktor (Bell, 1975; Mar, Bijlenga y Hernández, 1971).

Los estudios con rabia abortiva mencionados apuntan hacia la producción local de anticuerpos en el sistema nervioso central como punto crucial en la protección.

Ningún tipo de vacuna y método de vacunación periférica actualmente en uso, causa un aumento del título de anticuerpos en el líquido céfalo-raquídeo (Baer, 1975). En los pocos casos de la rabia abortiva humana, se ha observado un título de anticuerpos rábico en el líquido céfalo-raquídeo paralelo aunque no igual al que se encuentra en el suero (Vigilancia Epidemiológica, 1977), aun cuando ya se ha mencionado la posible influencia de la barrera peritoneolinfática para explicar el retraso en la presentación de los anticuerpos, una vez que los linfocitos inmunes han llegado a la linfa, todavía tienen que atravesar la barrera hemato-encefálica antes de que sea posible la producción local de anticuerpos (observaciones no publicadas).

Los linfocitos inmunes tienen que estar en condiciones de acudir al llamado de

emergencia del encéfalo lanzado por las células de la médula espinal en donde se asienta la primoinfección. En este fenómeno, el período de incubación de la protección, el que podría explicar por una parte las observaciones aquí consignadas y por otra, la de otros autores en torno a la protección antirrábica pos-vacunal y la rabia abortiva (Mar, Bijlenga y Hernández, 1971; Baer, 1975; Bell, 1975; Scrimini *et al.*, 1976).

Summary

Four batches of 20 mice each, of the CD-1 strain of albino mice and C57 of black mice were iP vaccinated with a rabies vaccine. For each strain of mice an homologous batch was kept as non vaccinated controls. Thirty days post-vaccination three of the four vaccinated batches of mice were put to death, their immune spleen cells were collected and transferred to homologous strain mice on a 1 to 1 basis. One, seven and twelve days post-plantation of the immune lymphocytes, the mice were challenged together with vaccinated and non vaccinated controls. The protection at day 1 was 0.07%, 25% at 7 days post-plantation and 75% at twelve days, while 100% of the non-vaccinated mice died of challenge and 87% of the vaccinated controls survived. Only the C57 mice were protected by the transplanted homologous lymphocytes. The antibody titer rose faster than the protection rate.

Protection to challenge required 13 days for maximum protection. These results seem to indicate that humoral protection is more important than cellular immunity and also that probably local antibody production in the brain is more important than antibodies in the general circulation.

Literatura citada

ARELLANO, S.C., P. SUREAU, D. BATALLA C., 1971, Evaluación de la eficiencia de la vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos: I. Antigenicidad, *Téc. Pec. Méx.*, 18:12-15.

ATANASIU, P., 1966, Quantitative assay and Potency test of antirabies serum. 2nd. Ed., Chap-

ter 22, *Laboratory procedures in rabies*, monograph series N° 13, 167-172.

BAER, G.M., 1975, The natural history of rabies, Vol. II, *Academic Press*, Capítulos 11, 13, 15, 20 y 21.

- BELL, J.F., 1975, Latency and abortive rabies in the natural history of rabies, *Academic Press*, 331-355.
- BIJLENGA, G. and E. HERNÁNDEZ, B., 1978, Adaptation attenuation and plaque purification of a Rabies isolate from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), *The Cornell Veterinarian*, In press.
- BIJLENGA, G. and E. HERNÁNDEZ, B., 1978, Testing of the vaccine potential of the plaque purified rabies virus strain V319 derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*) in México, *The Cornell Veterinarian*, In press.
- DEAN, D.J., 1966, The Nylar test for measuring potency of antirabies vaccines, 2nd. ed., Chapter 20, *Laboratory procedures in rabies*, monograph series N° 23. 157-162.
- HERNÁNDEZ B., E., J. MORALES, C. ARELLANO, J. CAMPOS, B. LÓPEZ y H. PÉREZ, 1976. Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovino producida en cultivos celulares, *Téc. Pec. Méx.*, 30, 57-63.
- HERNÁNDEZ, B., E.M., 1976, La rabia pareasiente bovina: Definición del problema y metodología de control, *Ciencia Veterinaria*, Vol. 1. *Prensa Universitaria*, pp. 103-131.
- JOHNSON, H.N., 1965, Rabies in *viral and rickettsial infections of man*, J.B. Lippincott Co., pp. 814-840.
- MAR C., R., G. BIJLENGA y E. HERNÁNDEZ B., 1971, Infección abortiva de Rabia, *VIII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias-SARH*, México, D.F.
- SEDWICK, W.D. and T.J. WIKTOR, 1967, Detection of rabies virus LCV and other RNA viruses in BHK 21/135 Agarose suspensions, *J. Virol.*, 1224-1226.
- SCRIMINI, C.A., MÁRQUEZ, A. RIERA, C.A. y ZAPATA M., 1976, Protección para rabia en ratones por transferencia de células, *I Congreso y IV Jornada Argentinas de Microbiología*, p. 22. Buenos Aires.
- VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1977, Rabia en un Técnico de Laboratorio en Nueva York, *Boletín Mensual de la oficina sanitaria Panamericana*, Vol. IX, N° 48, Ago. P. I.
- WIKTOR, T.J., 1971. New vaccines and the future of rabies prophylaxis. *Proc. int. conf. on appl. vacc. against viral Rickettsial and Bact. dis. of man. Sci. Publ. PAHO*, N° 226.
- WILSON, D.B. and E. BILLINGHAM, R., 1967, Lymphocytes and trasplantation immunity, *adv. Immunol.*, 7:189-193.