

NEUTRALIZACION "IN VITRO" DEL VIRUS RABICO POR TEJIDOS DE CUYES RECUPERADOS DE INFECCION RABICA¹

DR. OSCAR VALDÉS ORNELAS²

Se presenta un estudio de las alteraciones histopatológicas encontradas en cuyes que después de haber sido vacunados y expuestos al virus rábico presentaron parálisis y se recuperaron. Con el cerebro y el bazo procedente de estos animales sacrificados a los 19 y 30 días después de iniciada la parálisis, se prepararon suspensiones al 20 y 10% respectivamente, las que se mezclaron con diluciones progresivas de virus rábico y al ser inoculadas a ratones por vía intracerebral demostraron haber neutralizado el virus dando un promedio de dosis mortal 50% menor de $10^{-1.17}$ para las suspensiones cerebro-virus y $10^{-1.67}$ para las suspensiones de bazo-virus, en tanto que en los controles cerebro normal y solución salina se encontró una dosis mortal 50% de $10^{-5.22}$ y en los de bazo normal y solución salina frente al mismo virus, dieron un promedio de $10^{-5.45}$ demostrándose así la capacidad de las suspensiones de cerebro y bazo de los animales en estudio para neutralizar el virus rábico. (GAC. MÉD. MÉX. 97: 421, 1967).

INTRODUCCIÓN

LA RABIA de los animales, como infección transmisible al hombre, constituye una zoonosis de gran importancia en México, no sólo por los casos que se presentan en perros, sino también por la incidencia de rabia parálitica transmitida por vampiros a los bovinos¹ e incidentalmente al hombre a través de su mordedura.² La infección rábica una vez que aparece clínicamente en el

hombre, se ha considerado como incurable, aun cuando existe la duda de si algunos casos de parálisis postvacunales no mortales, pudieran considerarse, a la luz de los conocimientos actuales, como casos de rabia abortiva.

La presentación de infecciones inaparentes de rabia en animales ha sido discutida recientemente por lo que respecta a vampiros por Ruiz Martínez³ y en el trabajo de Bell,⁴ se hace una revisión minuciosa de casos presentados por diversos investigadores que aseguran haber observado perros portadores y transmisores del virus rábico que pa-

¹ Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 26 de octubre de 1966.

² Académico numerario, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Secretaría de Agricultura y Ganadería, Palo Alto, D. F.

recían clínicamente sanos; asimismo en el suero de animales silvestres como zorras, zorrillos y mapaches se han observado anticuerpos neutralizantes para el virus rábico, lo que indica el posible contacto de su organismo con dichos virus.^{5, 6} Del cerebro de algunos de estos animales silvestres aparentemente normales ha sido posible aislar el virus rábico.^{7, 8}

En el trabajo de Bell⁴ se describe un método para reproducir infecciones abortivas de rabia en ratones mediante inoculaciones intraperitoneales, demostrando la presencia del virus en la saliva al iniciarse la infección y, una vez abortada ésta, comprobando la resistencia de los animales paralíticos y recuperados, a la inoculación intracerebral del virus, así como la capacidad del tejido nervioso y del suero para neutralizar "in vitro" dosis elevadas del virus.

La técnica utilizada por Bell para las pruebas de cerebro neutralización fue la descrita por Kubes⁹ y Kubes y Gallia,¹⁰ quienes demostraron la capacidad del tejido nervioso de animales hiperinmunizados para neutralizar el virus rábico.

En el trabajo de rutina del Laboratorio de constatación del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias para la determinación de potencia de vacunas antirrábicas, producidas en el mismo Instituto con virus rábico cepa Flury alto pasaje (HEP) y cepa Flury de bajo pasaje (LEP), se observó que después de exponer los cuyes a la dosis de prueba con virus CVS según la técnica de la O.M.S.,¹¹ ocasionalmente algunos animales presentaban parálisis

del miembro posterior en donde se había aplicado la dosis de prueba, o de ambos miembros posteriores, para luego irse recuperando lentamente de dicha parálisis, por lo que se decidió investigar si la referida paresia se debía a alguna lesión del ciático producida en el momento de inocular el virus de prueba en el muslo, o si era causada por una infección rábica de la que se recuperaron los animales; asimismo se consideró conveniente investigar si el tejido nervioso y el bazo de estos animales eran capaces, y en qué grado, de neutralizar el virus rábico.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el curso del presente año y de un total de 206 cuyes utilizados para la prueba de potencia, según el método de la O.M.S.,¹¹ de los lotes de vacuna antirrábica producidos en el Instituto, 9 cuyes presentaron parálisis después de la dosis de prueba y se recuperaron, desapareciendo totalmente esta parálisis en dos de ellos, en tanto que en el resto persistió la parálisis que iba disminuyendo hasta el momento en que fueron sacrificados. Los primeros síntomas de parálisis aparecieron entre el 6o. y 8o. día después de la aplicación de la dosis de prueba.

Los cuyes recuperados se numeraron progresivamente con el objeto de identificarlos y correlacionar los resultados que se observaron. Los cuyes del 1 al 4, de los cuales en el 1 y en el 3 desapareció completamente la parálisis, fueron sacrificados por sangría a los 19 días después de la dosis de prueba, y los

cuyes del 5 al 8, 30 días después de dicha dosis. El cuy No. 9 permaneció paralítico durante 60 días habiendo muerto a consecuencia de un absceso hepático en el que se identificó *Capillaria* sp., no efectuándose pruebas de titulación en sus tejidos.

De los cuyes sacrificados se extrajeron asépticamente cerebro, cerebelo y médula, y de ellos se separó una porción para estudio histopatológico; el resto del material nervioso se trituró en un molino Ten-Broeck diluyéndose en solución salina al 0.85%, estéril, para obtener una suspensión al 20% que fue inactivada a 56°C durante una hora. En condiciones similares, con el bazo se prepararon soluciones al 10% inactivadas también a 56°C. Estas suspensiones se conservaron a -20°C hasta el momento de efectuar las pruebas de neutralización del virus.

Para las pruebas de neutralización del virus rábico se utilizaron ratones blancos de la variedad Swiss con peso de 18 a 21 g. Las suspensiones de cerebro y de bazo de cada uno de los 8 cuyes fueron mezcladas a partes iguales con diferentes diluciones en progresión logarítmica de virus rábico CVS e incubadas a 37°C durante una hora. Con cada una de las mezclas de cerebro-virus y bazo-virus se inyectaron por vía intracerebral 0.03 ml. a 6 ratones que fueron puestos en observación durante 21 días.

Siguiendo una técnica similar a la descrita anteriormente, se prepararon mezclas de suspensiones de cerebro y bazo procedentes de cuyes normales, se inactivaron una hora a 56°C y se pre-

pararon mezclas a partes iguales con diluciones de virus de rabia CVS con objeto de determinar si estos tejidos normales tenían alguna actividad neutralizadora del virus y al mismo tiempo saber si dichos tejidos, durante el período de incubación a 37°C, tenían algún efecto sobre el título del virus correspondiente. Un control adicional en cada grupo de pruebas fue hecho diluyendo el virus CVS simplemente en solución salina y calentando las diluciones a 37°C durante una hora antes de hacer las inoculaciones por vía intracerebral de 0.03 ml. a grupos de 6 ratones por cada dilución.

Con objeto de facilitar el trabajo y evitar que transcurriera un largo tiempo entre el momento después de terminada la incubación del material a 37°C y la inoculación de los ratones, tiempo durante el cual el material se conservó a 2°C, el trabajo se realizó formando 2 grupos de 4, con las suspensiones de tejido procedentes de los 8 cuyes paralíticos y recuperados, repitiendo en cada caso los controles, tanto con cerebro y bazo normales como con las diluciones de virus suspendidas en solución salina.

Los ratones inoculados se observaron diariamente anotando la presentación de síntomas o muerte de los mismos, y registrando los resultados finales a los 21 días después de la fecha de inoculación. Como muertes por rabia se anotaron solamente aquellas que ocurrieron después del 5o. día y mostrando los síntomas correspondientes. La estimación de las dosis mortales 50% se efectuó de acuerdo con el método de Reed y Muench.¹²

RESULTADOS

En el estudio histopatológico del material nervioso procedente de los 8 cuyes que fueron sacrificados después de presentar síntomas paralíticos y aparentemente recuperados no se encontraron corpúsculos de Negri después de colorear y observar preparaciones por el método de Seller y de inmunofluorescencia. Inoculado el material nervioso de 2 de estos cuyes a ratones por vía intracerebral no se reprodujo la enfermedad.

El examen cuidadoso de los cortes histológicos de los nervios ciáticos coloreados por hematoxilina-eosina y luxol-fast no mostró ninguna alteración. Las lesiones encontradas en el cerebro y en la médula espinal variaron en cada uno de los casos observados, encontrándose las alteraciones siguientes: En el cerebro, las grandes neuronas piramidales mostraron protoplasma muy granuloso que sugieren tigrolisis y en los capilares se observó marcada o discreta actividad glial y en algunos, satelitosis. En el cerebro de 4 cuyes se encontró un "estado esponjoso" parecido a la malacia.

En el cerebelo de uno de los cuyes se apreció "estado esponjoso" semejante al encontrado en el cerebro de otros cuyes, además de congestión de capilares, discreta infiltración perivascular por células redondas y una proliferación de la microglia más extensa que en los otros casos.

En la observación efectuada en los cortes de distintas secciones de la médula espinal se encontró en 6 de los cuyes, en las neuronas piramidales dor-

sales, así como en las ventrales motrices, protoplasmas muy granulosos que sugieren tigrolisis. En los otros dos cuyes no se encontraron lesiones en la médula espinal.

Los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización del virus rábico CVS por suspensiones de bazo y de cerebro de los cuyes paralíticos, así como los de las suspensiones de bazo y cerebro de cuyes normales y con solución salina se encuentran expuestos en las Tablas 1 y 2, en las que es posible observar que las suspensiones de bazo de los cuyes paralíticos neutralizan totalmente las diluciones de 10^{-3} en adelante, expresándose el promedio de neutralización de $10^{-1.67}$ sólo con objeto de establecer una comparación con el promedio $10^{-5.45}$ de los títulos obtenidos con las suspensiones de bazo normal y solución salina frente al citado virus.

En la Tabla 2 se puede observar que las suspensiones de cerebro de los cuyes paralíticos neutralizaron el virus CVS en mayor proporción, obteniéndose un promedio de DM 50% de $10^{-1.17}$ comparado con el promedio de $10^{-5.22}$ de los títulos observados con suspensiones de cerebro de cuyes normales y de solución salina.

En los resultados de los controles expresados en ambas tablas, se puede observar que tanto las suspensiones de bazo como las de cerebro, procedentes de cuyes normales, no tuvieron ningún efecto de neutralización sobre las diluciones del virus CVS, ya que los títulos encontrados fueron semejantes para dichas suspensiones.

TABLA 1

RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN DE VIRUS DE RABIA C.V.S. POR SUSPENSIONES AL 10% DE BAZO DE CUYES PARALÍTICOS

<i>Bazo de cuyes</i>	<i>Diluciones del virus</i>						<i>D.M. 50%</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
CP-1+	6/6++	5/6	0/5	0/6	0/6	0/5	10 ^{-2.4}
CP-2	4/4	3/3	0/4	0/4	0/4	0/4	10 ^{-2.5}
CP-3	0/0×	0/0×	0/6	0/6	0/6	0/4	10 ^{-2.5}
CP-4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	10 ⁻¹
CP-5	1/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ^{-1.5}
CP-7	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ^{-1.5}
CP-8	2/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
PROMEDIO DE NEUTRALIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE BAZO							10 ^{-1.67}
Controles:							
Bazo normal 1	4/4	5/5	5/5	6/6	6/6	3/6	10 ⁻⁶
Bazo normal 2	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6	1/5	10 ^{-5.16}
Sol. Sal. 1	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	0/6	10 ^{-5.4}
Sol. Sal. 2	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	0/6	10 ^{-5.25}
PROMEDIO DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN LOS CONTROLES							10 ^{-5.45}

+ CP: Cuy paralítico

++ Número de ratones muertos con síntomas de rabia, sobre número de ratones inoculados.

× No se efectuaron pruebas.

TABLA 2

RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE VIRUS DE RABIA C.V.S. POR SUSPENSIONES AL 20% DE CEREBRO DE CUYES PARALITICOS

<i>Cerebro de cuyes</i>	<i>Diluciones del virus</i>						<i>D.M. 50%</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
CP-1+	2/6++	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-2	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-3	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	10 ⁻¹
CP-5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-6	0/6	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	10 ⁻¹
CP-7	6/6	3/5	1/6	0/5	0/6	0/5	10 ^{-2.15}
CP-8	3/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	10 ^{-1.2}
PROMEDIO DE NEUTRALIZACION DE LAS SUSPENSIONES DE CEREBRO							10 ^{-1.17}
CONTROLES:							
Cerebro normal 1	6/6	6/6	6/6	5/6	2/6	1/6	10 ^{-4.76}
Cerebro normal 2	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	10 ^{-5.5}
Sol. Sal 1	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	10 ^{-5.4}
Sol. Sal 2	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	0/6	10 ^{-5.25}
PROMEDIO DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN LOS CONTROLES							10 ^{-5.22}

+ CP: Cuy parálítico.

++ Nmero de ratones muertos con síntomas de rabia sobreinoculados.

DISCUSIÓN

Aun cuando el consenso general de la literatura sobre rabia coincide en señalar a esta enfermedad como incurable y Pasteur señaló por primera vez que los perros podían enfermar de rabia y recuperarse, son numerosos los

casos en que distintos investigadores aseguran haber observado animales de diferentes especies que después de mostrar los síntomas clásicos de rabia se recuperan total o parcialmente. En la discusión de su trabajo, Bell⁴ hace una recopilación de la literatura concerniente a casos de animales resistentes

a la infección rábica, recuperados y portadores. Por lo anteriormente señalado, en nuestros trabajos de titulación de vacuna antirrábica, no extrañó el encontrar cuyes que después de ser vacunados e inoculados luego con virus rábico, presentarían parálisis y se recuperarían; sin embargo, se consideró conveniente iniciar estudios tendientes a determinar el mecanismo de resistencia en dichos animales.

Las lesiones encontradas en el estudio histopatológico de los cuyes paráliticos corresponden a los que se encuentran en otros casos de encefalitis y nos hacen pensar que el virus rábico aplicado en la dosis de exposición ha sido el responsable de las mismas, aun cuando para poder asegurarlo sería necesario repetir nuestras experiencias con un mayor número de animales, así como con animales inoculados con virus CVS y solamente vacunados con la cepa Flury.

La elevada neutralización del virus rábico CVS producida por las suspensiones de cerebro y bazo de los cuyes paráliticos, nos indica que en dichos tejidos existen substancias o elementos que es necesario determinar para saber si se trata de anticuerpos y cuál es el modo de acción y, en un futuro, previa purificación por fraccionamiento, si pudieran ser utilizados con fines diagnósticos conjugándose con sustancias fluorescentes o bien en la prevención o tratamiento de la rabia. Estos estudios ya se están realizando en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías con el suero, cerebro y bazo de animales vacunados y vacunados y expuestos.

Considerando que el método usado para determinar el poder neutralizante del cerebro y bazo de animales paráliticos y recuperados fue insuficiente, ya que en varios de los casos se observó neutralización del virus diluido a 10^{-1} , el trabajo actual se proseguirá efectuando mezclas de diluciones de los tejidos frente a cantidades fijas de virus.

Al comparar los resultados obtenidos con cuyes en este trabajo con los obtenidos por Bell con ratones, se observó un poder neutralizante mayor en los tejidos de los cuyes que en bazo y cerebro de ratones paráliticos y recuperados.

REFERENCIAS

1. Bell, J. F.: *Abortive rabies infection*. J. Infect. Dis. 114: 249-257, 1964.
2. Gier, M. T.: *Rabies in the wild*. J. Wildlife Mgt. 12: 142-153, 1948.
3. Johnson, H. N.: *Derriengue: Vampire bat rabies in Mexico*, Am. J. Hyg. 74: 189-204, 1948.
4. Kubes, V.: *Diferencias inmunológicas entre los virus rábicos*. Rev. Univ. San Carlos, Guatemala. 46: 201-212, 1948.
5. Kubes, V. y Gallia, F.: *La cerebroneutralización, nueva reacción biológica para el virus rábico. Su relación con la prueba de protección y la seroneutralización*. Bol. Inst. Inv. Vet., Caracas, 1: 3-45, 1943.
6. Málaga Alba, A. y Campillo Sáenz, C.: *Rabia humana transmitida por murciélagos, confirmación del primer caso en México*. Bol. Of. San Pan-Am. 42: 567-570, 1957.
7. O.M.S.: *Técnicas de Laboratorio aplicadas a la rabia*. Df. San Pan-Am, Monografía. Serie No. 23: 102-137, 1959.
8. Reed, J. L. y Muench, H.: *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. Am. J. Hyg. 27: 493-497, 1938.
9. Ruiz Martínez, C.: *Epizootiología y profilaxis regional de la rabia parálitica en las Américas*. Monografía. Ed. Protinal, Caracas, 1-110, 1963.
10. Sikes, R. K.: *Pathogenesis of rabies in wildlife. I, Comparative effect at varying doses of rabies virus inoculated into*

- foxes and skunks*, Am. J. Vet. Res. 23: 1041-1047, 1962.
11. Téllez Girón, A.: *El vampiro portador del virus del "derriengue"*, Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 1-2: 35:42, 1944.
12. Tirkel, E. S.: *Recent developments in the epidemiology of rabies*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 70: 445-451, 1958.
13. Wood, J. E. and Davies, D. E.: *The prevalence of rabies in populations of foxes in the southern states*. J. Am. Vet. Med. Ass. 135: (2) 121, 1959.

En la realización de este trabajo, efectuado en el Instituto Nal. de Investigaciones Pecuarias, se contó con la colaboración del pasante de M. V. Abraham Maldonado Coutolenc, del Laboratorio de Constatación y del Dr. Héctor Carrillo Melgar, del Laboratorio de Diagnósticos Histopatológicos, a quienes expreso mi agradecimiento.

COMENTARIO OFICIAL

DR. JOSÉ SOSA MARTÍNEZ¹

EL INTERESANTE trabajo del Dr. Valdés Ornelas expone 2 puntos que inducen al comentarista a enfocar su atención: 1) la producción experimental de cuadros de rabia abortiva producidos por medio de la inoculación de virus en animales con inmunidad de grado bajo, y que les ocasiona un cuadro paralítico regresivo; y 2) la demostración de que los extractos de tejidos de animales inmunizados contra la rabia, específicamente el bazo y el cerebro, tienen la capacidad de neutralizar al virus.

La producción experimental de rabia abortiva ha sido un fenómeno que tiene su parangón con otros fenómenos infecciosos que se rigen por el principio general de que la inmunidad parcial permite ocasionalmente manifestaciones clínicas benignas, limitadas y regresivas, caracterizadas por un período de incubación generalmente menor que cuando no existe inmunidad. Obedecen a los principios generales de la infección, en donde existe el germen infectante y hay la producción de anticuerpos. Sin embargo, deseamos aclarar que la evidencia negativa aportada de que no se encontró el virus por inoculación a otros animales o por técnicas histo-

patológicas o de inmunofluorescencia pueden deberse a que los cobayos con el cuadro de rabia paralítica fueron sacrificados muchos días después de iniciados los signos de enfermedad y cuando los tejidos contenían altos títulos de sustancias neutralizantes del virus.

El fenómeno es interesante y trascendente y acumula datos sobre el concepto de que, cuando menos en ciertos animales, la rabia como enfermedad no siempre es mortal.

El segundo punto es el mejor explorado en el trabajo del Dr. Valdés Ornelas. Es indudable que los extractos de bazo y de cerebro de animales vacunados contra la rabia tienen una marcada capacidad neutralizante del virus.

La actividad neutralizante del bazo es perfectamente lógica, ya que en su constitución histológica participan las 3 clases de células principalmente involucradas con la producción de anticuerpos y que son: las células plasmáticas, los linfocitos y los macrófagos.

A la célula plasmática se le ha considerado como una glándula unicelular productora de proteínas, principalmente por Caspersson, Fagraeus y otros autores escandinavos. Presenta alta concentración de ribonucleoproteí-

¹ Académico numerario. Secretaría de Salubridad y Asistencia.

nas y de un sistema complejo de membranas denominado retículos endoplásmico, que se asocian íntimamente con la síntesis proteica.

Por medio de inmunofluorescencia se puede observar la riqueza de anticuerpos específicos en el citoplasma de las células plasmáticas y probablemente no hay células del organismo animal tan bien señaladas como productoras de esas substancias.

No sucede exactamente lo mismo con los linfocitos y los macrófagos, en el sentido de que la evidencia en favor de que son células productoras de anticuerpos no es tan manifiesta. Sin embargo, estos 2 tipos de células también se consideran íntimamente relacionados con la inmunidad.

El mecanismo intrínseco del poder neutralizante del cerebro de los animales inmunizados contra la rabia es menos conocido. Es sabido que el sistema nervioso central produce anticuerpos. En la neurosífilis y en la cisticercosis cerebral, el líquido cefalorraquídeo puede contener anticuerpos aún cuando no existan en el plasma sanguíneo. Además, en cierto tipo de procesos inflamatorios, por ejemplo, encefalitis por virus, el cuadro histológico clásico es la infiltración perivascular de células de núcleo redondo, principalmente linfocitos y células plasmáticas. No se ha determinado con precisión la capacidad productora de anticuerpos de las células gliales, que también participan

activamente en los cuadros inflamatorios descritos.

Los trabajos de Kubes y Gallia, mencionados por el Dr. Valdés Ornelas, llaman verdaderamente la atención, ya que además de señalar la capacidad neutralizante del cerebro de animales inmunizados, demuestran una alta capacidad específica en su neutralización, fenómeno que no se puede hacer fácilmente con los anticuerpos circulantes,

Sería muy importante determinar por medio de precipitación, de electroforesis o de inmunodifusión la naturaleza de la substancia inhibidora que se encuentra en los tejidos específicamente, el cerebro. Explorar la posibilidad de producir un virus rábico marcado para determinar la clase de células en que se fija dentro de la estructura histológica del cerebro, para así llegar a determinar en dónde radica el poder neutralizante del virus. Tratar de investigar la producción de interferón y de otras substancias, que, sin ser anticuerpos, neutralicen el virus en su acción patogénica.

El Dr. Valdés Ornelas, en el instituto que dirige con tan singular acierto, ha encauzado las actividades en el terreno de la investigación, tan necesaria en cualquier actividad microbiológica. Su experiencia como maestro de generaciones de bacteriólogos le hace comunicar el entusiasmo a sus colaboradores. Mucho le agradezco la oportunidad brindada para hacer el presente comentario.