

Estudio leucocitario en animales de laboratorio infectados con virus de Encefalitis equina Venezolana.

Hugo Hernández Henríquez, Yaniria Betancourt, Cristina Navarro y Soledad Núñez.

Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela.

Resumen. Se estudió el número de glóbulos blancos y fórmula leucocitaria en animales de laboratorio tales como ratones, ratas y conejos antes y después de producirles una infección experimental aguda con el virus de la Encefalitis equina Venezolana. Se observó una leucopenia que varió de acuerdo a la sensibilidad de la especie animal. Las fórmulas leucocitarias presentaron variaciones, acompañadas de células atípicas las cuales persistieron hasta el final de la infección. Se observó también una vacuolización celular que alcanzó al 6% y que no estuvo presente nunca en los controles. Los conejos presentaron una eosinofilia que abarcó hasta un 36% en su fórmula leucocitaria poco antes de morir. Algunas ratas sobrevivieron y al cabo de 14 días presentaron títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación entre 1/80 - 1/160, lo cual indica su resistencia a la infección viral.

Leucocitary study in laboratory animals infected with Venezuelan Equine Encephalitis virus.

Invest Clin 22(3):143-157, 1981.

Abstract. The number of white cells and leucocitary formula in laboratory animals as rats, mice and rabbits before and after producing an acute experimental infection with Venezuelan equine Encephalitis was studied. The leucocitary formula presented variations, accompanied by atypical cells which persisted to the end of infection. We also observed cellular vacuolization that reached 6% which was never present in the control animals. The rabbits presented eosinophilia that reached 36% before death. Some rats survived and after 14 days presented antibody-inhibitors titers of the hemagglutination between 1/80 - 1/160, which indicates their resistance to the viral infection.

INTRODUCCION

El estudio de las células sanguíneas ha sido de gran ayuda para el diagnóstico de un gran número de enfermedades. Las células blancas, especialmente las mononucleares, ocupan un importante papel en la inmunidad del huésped, pues la acumulación de macrófagos en el sitio de inflamación es particularmente notable en la defensa del huésped contra los agentes infecciosos (1). La habilidad de algunos virus de alterar las funciones del sistema inmune de un huésped infectado es bien reconocida (15, 21, 23).

In vivo, se ha demostrado que muchos virus causan lesiones necróticas de células y tejidos linfoides (16). También se ha demostrado in vitro, que los linfocitos preparados de sangre periférica soportan la replicación viral (20). Es también conocido que varios virus pueden ser propagados en linfocitos humanos de sangre periférica (5, 6, 7, 10, 11), entre otros, los virus de estomatitis vesicular (3), fiebre amarilla (22) y sarampión (6); sin embargo, ha habido poca información en el campo de los arbovirus con excepción del dengue y la fiebre amarilla que han sido más estudiados y donde también se ha encontrado que in vitro se replican en linfocitos y monocitos de sangre periférica (12).

Se ha demostrado que en las infecciones humanas el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) muestra una predilección por el sistema retículo endotelial (4). En un estudio de la interacción de este

virus con células blancas de sangre periférica, se demostró que los macrófagos derivados de monocitos permiten el crecimiento del virus de la EEV (12).

Es importante además hacer notar que muchos autores han encontrado en las células blancas de personas infectadas con virus, unas vacuolas en el citoplasma de las células, y han coincidido en afirmar que dependen de la interacción viral. Así tenemos que en 1952 Rothlin y Undritz hacen varias consideraciones con relación a los leucocitos vacuolados, y afirman que los eosinófilos jóvenes de médula ósea contienen frecuentemente vacuolas de dimensiones variables (17).

También en 1960 a raíz de una epidemia de EEV al Norte del Estado Zulia en la zona de la Guajira Venezolana se reportaron células vacuoladas, principalmente monocitos, en la sangre periférica de pacientes con síntomas de la enfermedad (13). Se conoce desde hace muchos años la vacuolización leucocitaria en la Mononucleosis Infecciosa y hace pensar que el virus de Epstein Barr en determinadas ocasiones, tiene implicaciones etiológicas en el proceso de vacuolización celular (7).

A pesar de que el virus de la EEV fue aislado en Venezuela en 1938 (9) y de la frecuencia y recurrencia de las epidemias, son pocos los trabajos que nos describen adecuadamente el papel y variaciones que juegan los leucocitos en el curso clínico de dicha enfermedad (2).

En base a esta escasa información nos propusimos estudiar las

alteraciones del número de células blancas y de la fórmula leucocitaria que se suceden en los primeros días de infección experimental con el virus de la EEV, utilizando animales de laboratorio como ratones, ratas y conejos.

MATERIALES Y METODOS

Infección de ratones. Se realizaron cuatro experimentos con grupos de diez ratones adultos albinos suizos. En cada experimento se infectaron ocho ratones mediante la inyección intraperitoneal de 100 DL 50 del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (cepa Guajira E-765) de la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas, y los otros dos ratones se dejaron como control. Previo a la inoculación se tomó una muestra de sangre de cada ratón, incluyendo a los controles, mediante la introducción de un tubo capilar en el ángulo interno del ojo, con el objeto de obtener los valores basales de glóbulos blancos y fórmula leucocitaria tanto para aquellos que iban a ser infectados como los usados para control. Luego se procedió a la inoculación por vía intraperitoneal, de 0.03 ml de virus antes mencionado.

Cada 24 horas se repetía el procedimiento de sangrado de los ratones y se procedió al conteo de glóbulos blancos. Este último se realizaba con pipeta Thomas dilución final 1/20, con solución de ácido acético al 4%.

Los contajes se realizaron en cámaras de Neubauer; igualmente se

hicieron frotis de sangre, los cuales se fijaron y tiñeron con líquido de Wright por dos minutos y posteriormente con Giemsa durante 15 minutos.

A los valores obtenidos de cada uno de los animales infectados, se les hizo un promedio que representaba los valores para ese día; igualmente, se procedió con las muestras de los controles. Tanto los contajes como las fórmulas leucocitarias se realizaron el mismo día de la obtención de la muestra en un microscopio de luz marca Kyowa.

Infección de ratas. Se desarrollaron tres experimentos con grupos de seis ratas Sprague Dawley, adultas, utilizando cuatro para la inoculación con virus y dos como control.

El procedimiento experimental, la dosis y vía de inoculación fueron similares a los utilizados en ratones.

Infección de conejos. Se desarrollaron cuatro experimentos con grupos de tres conejos de cuatro meses; cada experimento tenía dos conejos infectados y un conejo se dejaba como control.

Para la inoculación se inyectaba por vía intramuscular 10 DL 50 de cepa viral anteriormente señalada. Las muestras de sangre previas a la infección y las posteriores se tomaron con jeringa de tuberculina, de la vena marginal de la oreja. El procedimiento y equipo utilizado con las muestras fue el mismo utilizado con los ratones.

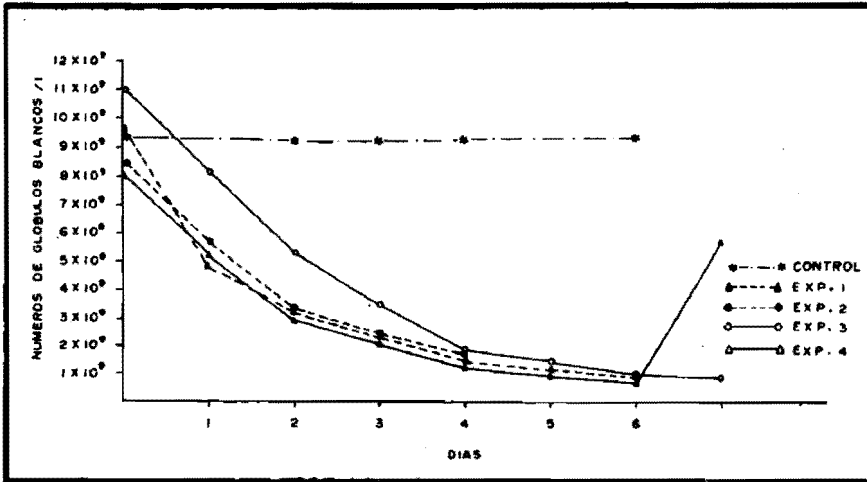


Fig. 1. Ratones adultos inoculados con virus de Encefalitis equina venezolana. Contaje de glóbulos blancos a diferentes intervalos de tiempo.

RESULTADOS

Experimento en ratones. Los valores basales de las células blancas antes de la inoculación presentaron un conteo de $8-11 \times 10^9$ glóbulos/l. A las 24 horas de la infección se observó en todos los grupos experimentales una marcada leucopenia; la leucopenia se fue acentuando progresivamente hasta alcanzar un máximo al sexto día (Fig. 1). Los valores de leucopenia, correlacionándolos con los valores normales de glóbulos blancos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$).

Los signos visibles de la enfermedad comenzaron al 4º día después de la infección, observándose ratones erizados, incoordinados, parálisis parcial, anorexia, parálisis total; y la mortalidad ocurrió entre el 6º y 7º día. Sin embargo, pudimos

observar, en el último experimento, que en un estado de parálisis total pre-mortem, los ratones presentaban un ligero aumento en el conteo de glóbulos blancos (Fig. 1).

Las variaciones de la fórmula leucocitaria tanto en los ratones sanos como en los infectados con virus pueden observarse en la Tabla I. Las cifras expresadas como normales o controles, corresponden al promedio de los valores obtenidos en las muestras tomadas al inicio y a lo largo del experimento. Estos valores no sufrieron variaciones durante el desarrollo del experimento por lo cual se agrupan en una sola columna.

Al primer día después de la infección se observó el descenso en el número de los linfocitos, continuando con este rápidamente al 2º día. Al sexto día se estabilizó el conteo. También se apreció un aumento de neutrófilos entre el basal y el 2º día

TABLA I
RATONES ADULTOS INOCULADOS CON VIRUS DE ENCEFALITIS
EQUINA VENEZOLANA. FORMULA LEUCOCITARIA A DIFERENTES
INTERVALOS DE TIEMPO

Células	Ratones Controles*	Ratones infectados						
		Basal**	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días
Valores absol. Glób. blancos	9175	9325	5962	3675	2575	1612	1183	900
Linfocitos	6514	6528	3041	1250	1313	967	733	621
Neutrófilos	2477	2518	2742	2315	1082	848	308	135
Eosinófilos	92	93	60	-	-	-	-	-
Monocitos	92	186	119	37	51	-	12	45
Atípicas	-	-	-	73	129	161	130	99

* Los valores de la columna Ratones Controles representan un promedio de los valores obtenidos a lo largo del experimento y como éstos no presentaron variaciones considerables, se agrupan en una sola columna, para no repetir dichos valores.

**Corresponden al promedio de los valores obtenidos en las muestras tomadas antes de ser infectados.

de 2518 a 2315 con una $p < 0,01$ y entre el 2º y el 6º día una neutropenia de 2315 a 135 con una $p < 0,00001$. En las fórmulas leucocitarias apreciamos unas células con características diferentes a las que normalmente se encuentran en sangre periférica de ratones, ratas y conejos, los cuales presentaban: variación en el tamaño tanto en el núcleo como en el citoplasma con basofilia, y muchas vacuolas; a éstas células las calificamos como atípicas (Figs. 2 y 3).

Es de hacer notar que las células atípicas aparecieron al 2º día y aumentaron progresivamente hasta la muerte de los ratones, llegando a

observarse hasta 161 células (10%) de la fórmula leucocitaria.

Se pudo observar la presencia de vacuolas en todos los tipos de células blancas especialmente en monocitos y segmentados neutrófilos encontrando hasta un 6% de dichas células en la fórmula; en algunos casos se observaron hasta 20 vacuolas en una misma célula, (Figs. 4 y 5). No observamos vacuolización en los glóbulos blancos de los controles.

Experimento en ratas. Los valores basales de glóbulos blancos fueron 16.000 y luego de inocular el virus ocurría una leucopenia que progresaba hasta el tercer día con estadística significativa de

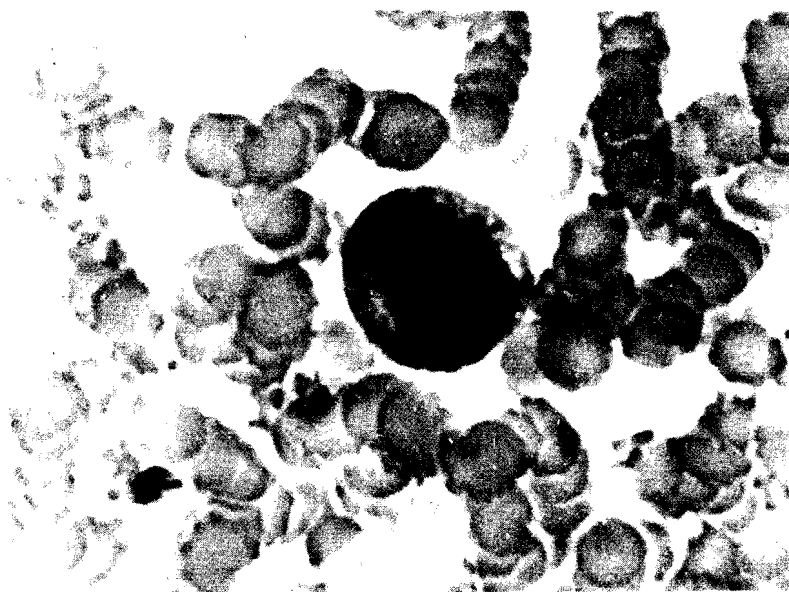


Fig. 2. Linfocito atípico.

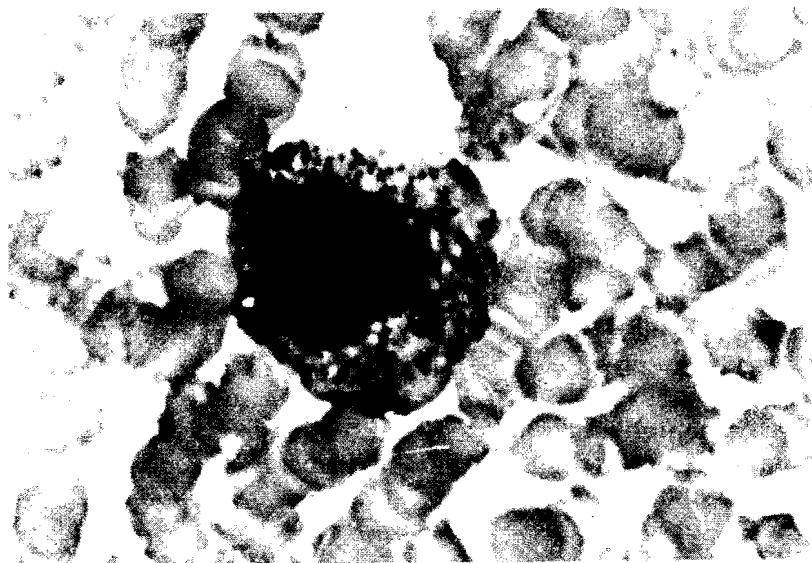


Fig. 3. Metamielocito neutrófilo con algunas vacuolas en el citoplasma.

$p < 0,0001$, para luego ascender el conteo de blancos hasta alcanzar sobrepasar los valores basales (Fig. 6).

El número de células atípicas en la fórmula leucocitaria fue muy pequeña y aparecieron al 9^o día, cuando también comenzaba la linfopenia

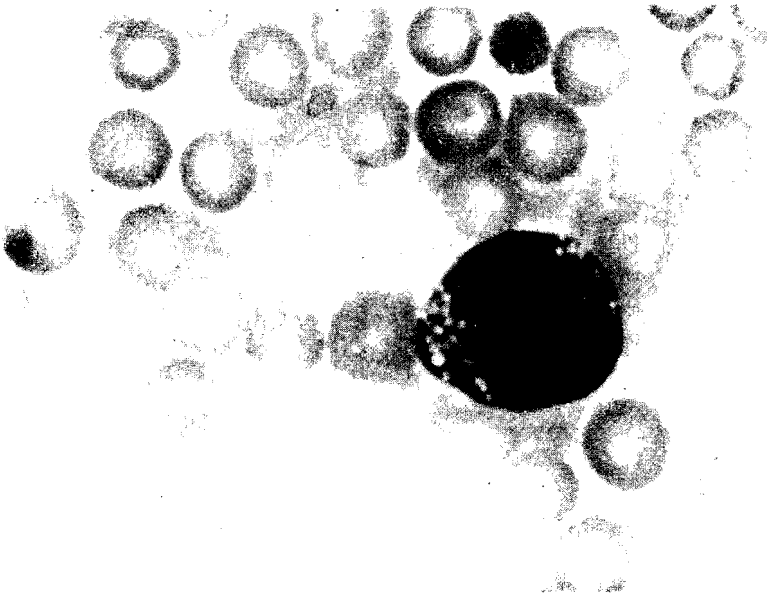


Fig. 4. Monocito con abundantes vacuolas en el citoplasma.

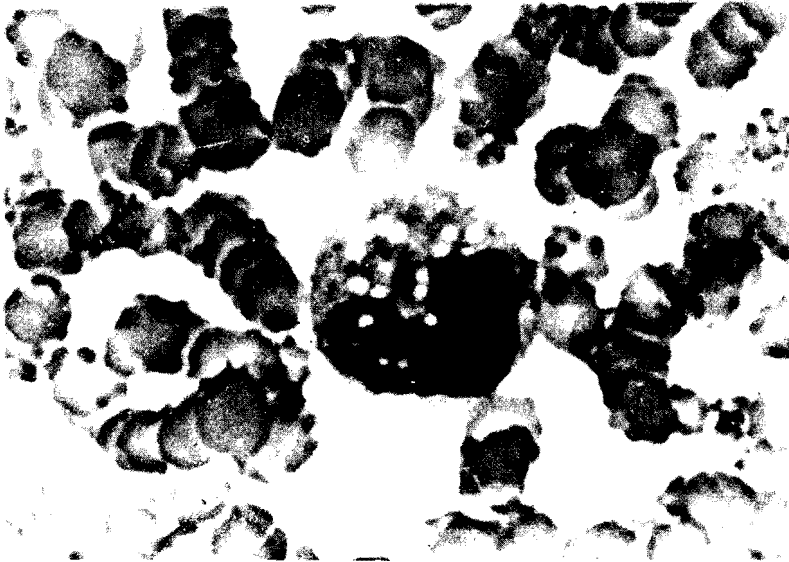


Fig. 5. Monocito con vacuolas en el citoplasma y en el núcleo.

la cual fue menos acentuada y se normalizó 48 horas después. Las ratas que son animales menos sensibles al virus que el ratón, se compararon los neutrófilos entre el ba-

sal y el 9º día encontrándose no significativa la variación. Sólo se observaron las vacuolas en las muestras tomadas en el 2º y 3er. día. Los controles no mostraron ningún

TABLA II
RATAS INOCULADAS CON VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA. FORMULA
LEUCOCITARIA A DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO

Células	Ratas Controles*	Ratas infectadas													
		Basal**	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días	9 días	10 días	11 días	14 días		
Valores absol. Glób. blancos	16043	16050	13200	9883	7783	9766	10633	12950	14900	16133	17600	17000	16750		
Linfocitos	11230	11395	8448	6099	5837	7032	7258	9065	10430	7260	10384	13940	11726		
Neutrófilos	4011	4173	4488	2721	1712	2344	3033	3496	4470	7744	6512	1870	4187		
Eosinófilos	321	161	132	188	78	195	108	-	-	484	-	-	168		
Monocitos	481	321	132	375	156	195	434	389	-	322	352	680	335		
Atípicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	323	352	510	335		

* Los valores de la columna Ratas Controles representan un promedio de los valores obtenidos a lo largo del experimento y como éstos no presentaron variaciones considerables, se agrupan en un a sola columna, para no repetir dichos valores.

**Corresponden al promedio de los valores obtenidos en las muestras tomadas antes de ser infectadas.

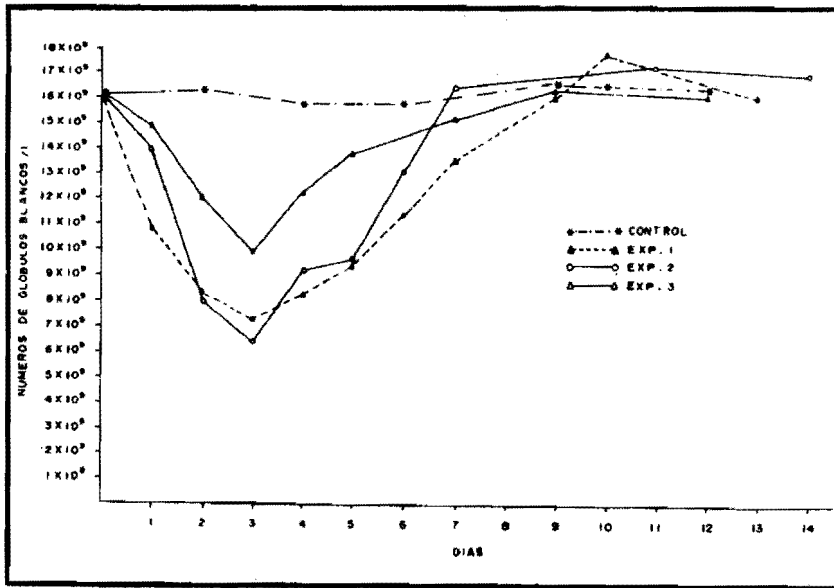


Fig. 6. Ratas inoculadas con virus de Encefalitis equina venezolana. Contaje de glóbulos blancos a diferentes intervalos de tiempo.

cambio con respecto a sus valores basales (Tabla II).

Observamos que muchas ratas sobrevivieron aún cuando aparentemente sufrían la enfermedad. A éstas se les sangró al final del experimento y se detectaron anticuerpos IH en títulos que variaron entre 1/80 - 1/160. Las ratas comenzaron a morir a partir del 9º día después de la inoculación.

Experimento en conejos. En los conejos, al igual que los ratones y ratas, ocurre también una leucopenia muy marcada. Conociendo con anterioridad la sensibilidad del conejo al virus de Encefalitis Equina Venezolana procedimos a hacer el contaje de glóbulos blancos antes de las 24 horas después de la infección;

a las 17 horas ya había descendido la cuenta blanca; la variación de la cuenta de glóbulos blancos se puede observar en la Fig. 7.

En estos experimentos pudimos apreciar la leucopenia que aumenta hasta 41-43 horas para corregirse progresivamente con las mismas tendencias a subir el número de leucocitos que observamos en los experimentos de ratas.

Los conejos no presentaban ningún signo exterior de la enfermedad, sino 1 ó 2 horas antes de morir y esto tan sólo se manifestaba por una ligera contracción de los músculos del tren posterior; pero si se pudo constatar que su temperatura subía desde 38-39°C que es la temperatura de un conejo normal hasta 41-

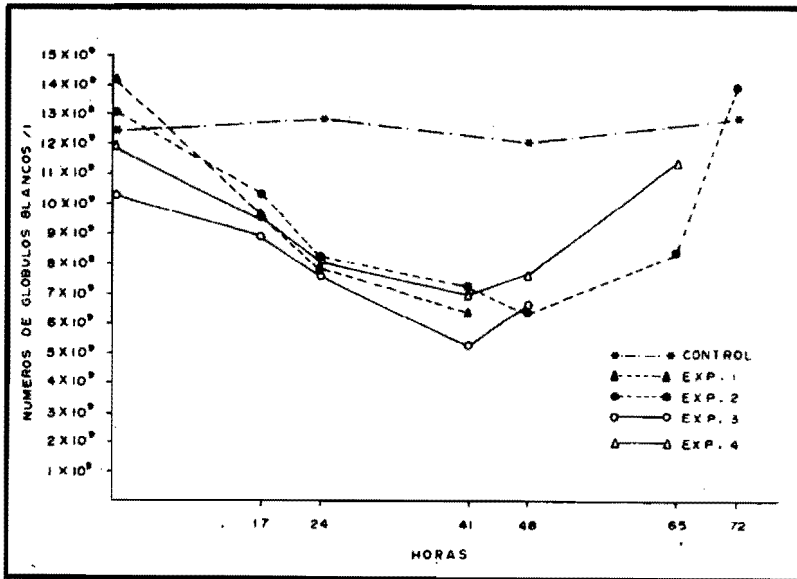


Fig. 7. Conejos inoculados con virus de Encefalitis equina venezolana. Contaje de glóbulos blancos a diferentes intervalos de tiempo.

42°C. De este modo nos dábamos cuenta del efecto de la infección. La mortalidad de los conejos ocurrió entre 41-72 horas.

Se observó que la fórmula leucocitaria de los conejos se invertía bruscamente a las 17 horas y además apareció una eosinofilia muy marcada a las 24 horas; ésta se prolongaba hasta la muerte de los animales. En los conejos encontramos en el contaje de neutrófilos entre el basal y las 17 horas después de inoculados, un aumento de 3185 a 7002 con una $p < 0,05$, y entre 17-72 horas un descenso de 7002 a 2047 con una $p < 0,01$. La presencia de células atípicas y vacuolas la pudimos observar después de las 65 horas (Tabla III).

DISCUSION

El contaje de glóbulos blancos en ratones nos demuestra, que la presencia en el organismo del virus de la EEV en estos animales provoca una leucopenia que se acentúa antes de que las manifestaciones clínicas causadas por el virus reflejan la invasión del sistema nervioso central. Estas leucopenias virales se han demostrado también en experimentos realizados en caballos y monos y en casos de infección en humanos, aún cuando la severidad de la virulencia en estos últimos no ha sido igual (2).

Todos los ratones inoculados con el virus de la EEV murieron con los signos clásicos de la enferme-

TABLA III
CONEJOS INOCULADOS CON VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA
VENEZOLANA. FORMULA LEUCOCITARIA A DIFERENTES INTERVALOS
DE TIEMPO

Células	Conejos Contro- les*	Conejos Infectados						
		Basal**	17 hr	24 hr	41 hr	48 hr	65 hr	72 hr
Valores absol. Glób. blancos	12325	12250	9462	7837	6337	6616	9600	13650
Linfocitos	8874	8575	1892	1332	1585	2977	2880	3003
Neutrófilos	3205	3185	7002	3997	3612	2580	1728	2047
Eosinófilos	246	245	568	2116	1014	860	3360	4914
Basófilos	-	-	-	313	63	199	288	956
Monocitos	-	245	-	78	63	-	192	273
Atípicas	-	-	-	-	-	-	1152	2457

* Los valores de la columna Conejos Controles representan un promedio de los valores obtenidos a lo largo del experimento y como éstos no presentaron variaciones considerables, se agrupan en un a sola columna, para no repetir dichos valores.

**Corresponden al promedio de los valores obtenidos en las muestras tomadas antes de ser infectadas.

dad, parálisis, fiebre y con una leucopenia aguda. Sin embargo, en un experimento pudimos observar que, unas horas antes de morir, los ratones presentaron un aumento de los glóbulos blancos.

La anterior observación la hicieron también Theiler y Downs afirmando que el primer ataque febril está asociado al tiempo de multiplicación viral en el interior del organismo y ésto se acostumbra a asociar con una leucopenia. Sin embargo una leucocitosis es frecuentemente asociada más tarde en mani-

festaciones más severas, tales como encefalitis (19).

Al estudiar las fórmulas leucocitarias de la sangre de los ratones pudimos notar que después de las 48 horas aparecían células atípicas y que éstas iban aumentando a medida que progresaba la enfermedad en el ratón; no pudimos demostrar si ésto es debido a efecto del daño directo en los tejidos productores de glóbulos blancos por la acción del virus, o a daño intravascular; en trabajos sucesivos trataremos de estudiar la influencia que tiene el virus sobre estos tejidos. Levitt y Miller

señalan que las infecciones a virus de EEV a veces son pantrópicas con un efecto marcado sobre el sistema retículo endotelial y añaden, especulando un poco, que las células mononucleares pudieran esparcir la infección a otros tejidos u órganos también del sistema retículo endotelial y en esa forma producir una fulminante y generalizada infección (12).

Al segundo día después de la infección en ratones se observaron células vacuoladas, siendo más frecuentemente la vacuolización en las células atípicas, monocitos y segmentados neutrófilos. Aún cuando este fenómeno no ha sido bien estudiado algunos autores lo asocian como una interrelación viral (14).

La leucopenia que también ocurrió en las ratas inoculadas con virus, nunca se observó después del tercer día, demostrando una resistencia especial al virus de la EEV, hasta el punto de que algunas ratas quedaban vivas después de 14 días. A estos animales se les tomó suero para hacerles prueba de inhibición de la hemaglutinación contra el virus de EEV y pudimos constatar la presencia de anticuerpos con títulos de 1/80 - 1/160. Otro hecho que habla de la resistencia de las ratas es que la fórmula leucocitaria nunca se invirtió.

Los conejos mostraban una sensibilidad muy marcada al virus de la EEV. La leucopenia ocurría antes de las 24 horas y duraba hasta las 41-48 horas como en los casos anteriores, luego el conteo de glóbulos blancos se elevaba. El punto más

notable en la fórmula leucocitaria de los conejos es la presencia de una eosinofilia muy marcada desde las 17 horas aumentando hasta la muerte. En todos los casos los conejos morían antes de las 72 horas.

Spry encontró que inoculando animales de laboratorio con una suspensión de células de linfomas, se producía una eosinofilia marcada que atribuyó a un bloqueo de las vías de migración hacia los tejidos (18). Cabe ahora definir si este fenómeno de la eosinofilia que se presentó en nuestro experimento se debe a una reacción al virus o como en el caso anterior a un bloqueo de las vías de eliminación.

En conclusión pudimos comprobar en ciertos animales de laboratorio infectados con el virus de la EEV, que una leucopenia se hacía presente como parte inicial de la infección y que luego ocurría un aumento de glóbulos blancos con una marcada producción de células atípicas, apareciendo en muchas de las células el fenómeno de vacuolización.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- DANNEMBERG A.M. : Macrophage in inflammation and infection. *N Eng J Mri* 293:489-493, 1975.
- 2- DIETZW H., PERALTA P., JOHNSON K.: Ten clinical cases of human infection with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 28(2): 329-344, 1979.
- 3- EDELMAN R., WHELOCK E.F.: Specific role of each human leukocyte type in viral infection. I. Monocyte as

- host cell for Vesicular stomatitis virus replication in vitro. *J Virol* 1 :1139-1149, 1967.
- 4- EHRENKRANZ N.J., VENTURA A.K.: Venezuelan equine encephalitis virus infection in man. *Ann Rev Med* 25:9-14, 1974.
 - 5- GRESSER I., CHANY C.: Multiplication of poliovirus type I in preparation of human leukocytes and its inhibition by interferon. *J Immunol* 92:889-895, 1964.
 - 6- JOSEPH B.S., LAMPERT P.W., OLDSTONE M.B.A.: Replication and persistence of measles virus in defined subpopulation of human leukocytes. *J Virol* 16:1638-1649, 1975.
 - 7- KAPLAN J., SHOPE T.C., PETERSON Jr W.D.: Epstein Barr virus negative human malignant T-cell line. *J Exp Med* 139:1070-1076, 1974.
 - 8- KLEINERMAN E.S., SNYDERMAN R., DANIELS C.A.: Depressed monocyte chemotaxis during acute influenza infection. *Lancet* ii:1063-1066, 1975.
 - 9- KUBES V., RIOS F.A.: The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90:20-21, 1939.
 - 10- MUCOPLAST C.C., JOHON D.W., TEUSCHER E.: Surface immunoglobulin of circulating lymphocytes in chronic bovine diarrhea abnormalities in cell populations and cell function. *Ann J Vet Res* 34:1101-1104, 1975.
 - 11- NAHMIAS A.J., KIBRICH S., ROSAN R.C.: Viral leukocyte interrelationships. I. Multiplication of a DNA virus herpes simplex in human leukocytes cultures. *J Immunol* 93:69-74, 1964.
 - 12- NEIL H., LEVITT, MILLER H.V., EDELMAN R.: Interaction of Alphavirus with human peripheral leukocytes: in vitro replication of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in monocyte cultures. *Infect Immun* 24:642-646, 1979.
 - 13- NEGRETTE A.: Encefalitis equina venezolana. Fórmula leucocitaria relativa. *Invest Clin* 9(25):53-65, 1968.
 - 14- NEGRETTE A.: Leucocyte debris in peripheral blood from patients with Venezuelan encephalitis. *Invest Clin* 11(36):13-20, 1970.
 - 15- NOTKINS A.L., MERGENHAGEN S.E., HOWARD R.J.: Effect of virus infection on the function of the immune system. *Ann Rev Microbiol* 24:525-538, 1970.
 - 16- OLDING L.B., JENSEN F.C., OLDSTONE M.B.A.: Pathogenesis of cytomegalovirus infection. I. Activation of virus from bone marrow derived lymphocytes by in vitro allogenic reaction. *J Exp Med* 141:561-572, 1975.
 - 17- ROTHLIN E., UNDRITZ E.: Plances d'hematologie Sandoz. Sandoz Frobenius Ltd. Basilea p 16-62, 1952.
 - 18- SPRY C.: Mechanism of eosinophilia. *Brit J Haematol* 22:407-413, 1972.
 - 19- THEILER M., DOWNS W.G.: The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of the Rockefeller Foundation Virus Program. 1951-1970.
 - 20- TRUILT R.L., SCHECHMEISTER I.L.: The replication of bovine diarrhea mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro. *Arch Virosforsch* 42: 78-87, 1973.
 - 21- VIRELISIER J.L.: Mechanism of immunodepression induced by viruses.

- Possible role of infected macrophages. *Biomedicine* 22:255- 261, 1975.
- 22- WHEELOCK E.F., EDELMAN R.: Specific role of each human leukocyte type in viral infections. III. 170 D Yellow Fever virus replication and interferon production in homogenous leukocyte treated with phytohemagglutinin. *J Immunol* 103: 429-436, 1969.
- 23- WOODROFF JF, WOODROFF IJ: The effect of viral infection on the function of the immune system. In: *Viral Immunology and Immunopathology*. Notkins AL, ed. p 393-418. Academic Press Inc., New York, 1975.