

Preparación de suero antirrábico con virus de rabia parálitica de los bovinos

Control comparado con distintas especies y técnicas varias

POR LOS DOCTORES PEDRO J. SCHANG, (*) JUAN A. RODRIGUEZ LOUSTAU (**) Y HORACIO R. RIZZO (***)

Nos propusimos en este estudio determinar en qué especie animal y por qué vías y técnicas se pueden obtener los mejores sueros antirrábicos medidos por su poder neutralizante sobre el virus.

Este primer trabajo lo hemos realizado utilizando como virus de hiperinmunización un virus de rabia parálitica de los bovinos procedentes del Norte Argentino y fijado por pasajes intracerebrales en equinos y conejos.

Utilizamos como animales productores de los sueros, conejos, ovinos y equinos, y como vías de preparación de los mismos, la subcutánea, intradérmica, intraperitoneal y endovenosa y con técnica de hiperinmunización a corto y largo plazo.

El todo en controles estrictamente comparados, usando simultáneamente los mismos antígenos y realizando las titulaciones con neutralización de dosis iguales de virus fijo, frente a diluciones de los distintos sueros e inoculación a conejos por vía intracerebral, en lotes numerosos, de modo que las lecturas de los resultados fuesen estrictamente comparables.

ANTECEDENTES

Desde Babes y Lepp (1) y Tizzoni y Centanni (2), quienes demostraron que era posible obtener sueros rabicidas, hasta Marie (3), que pre-

(*) Profesor titular de Sueros y Vacunas.

(**) Profesor adjunto de Sueros y Vacunas.

(***) Jefe de trabajos prácticos de Sueros y Vacunas.

paró una vacuna con virus adicionado de suero, numerosísimos experimentadores han estudiado el uso posible de suero antirrábico para el tratamiento experimental y de aplicación en los mordidos o inoculados con rabia.

C. Fermi (4), en 1909 estudió comparativamente el valor protector de sueros antirrábicos preparados en caballo, asno, oveja, perro y ganso, obteniendo el más alto título en caballo y decreciendo su valor en las otras especies, en el orden anotado. Pero, esos sueros, eran preparados por distintos laboratorios y, en consecuencia, con distintos antígenos y métodos.

Más recientemente Proca, Babes y Jonnesco (5) aplican suero o suero y luego vacuna al hombre mordido por canes rabiosos. Igual estudio realizan investigadores británicos en las Indias y Karl Habel (6) realiza un amplio estudio experimental.

Cabe recordar que en la Conferencia Internacional de la Rabia en 1927 fué Pereyra da Silva quién planteó el interrogante de si la presencia de sustancias rabicidas es índice de inmunidad, consulta que dió lugar a muchas experiencias (7) (8) (9) (10) (11).

Dejando de lado la divergencia de opiniones, de numerosos autores, sobre el verdadero significado inmunológico de la presencia de anticuerpos específicos en los sueros, de las personas, o animales, tratados con vacunas antirrábicas, consideramos que, como base de una amplia experimentación al respecto, convenía saber con qué técnica y en qué especies se lograría obtener el mejor título neutralizante con suero antirrábicos.

Este comienzo de investigación lo presentamos por los interesantes resultados comparados obtenidos y por haber logrado preparar, en equinos, sueros de muy alto título neutralizante, frente al virus homólogo de cerebro de conejo.

TÉCNICA UTILIZADA

Utilizamos en estas experiencias virus de rabia paralítica de los bovinos, fijado por pasajes por cerebro de equino desde 1932 a 1946, y con 19 pasajes, luego por cerebro de conejo.

Hemos empleado como animales productores, conejos, ovinos y equinos, con test comparados, por las vías endovenosa, intraperitoneal, subcutánea e intradérmica y con intervalos corto de hiperinmunización y otros con intervalo de varios meses.

Los controles de valor neutralizante los efectuamos mezclando in vitro 6 d. m. m., por vía intracraneal, para el conejo, con cantidades decrecientes del suero de prueba (0,1m 0,01, 0, 001) e inoculación de la mezcla por vía intracerebral a conejo.

Las técnicas usadas por distintos autores (12) para medir los sueros, en su poder neutralizante y protector, resultan difícilmente comparables por haber usado distintas técnicas, diferentes antígenos (13), distintas vías de prueba y variadas especies en los test. Pero la mayoría obtienen sueros de muy bajo título neutralizante y no logran fijar una técnica uniforme.

El antígeno de hiperinmunización de los seroproductores fué en todos los casos vacuna preparada con virus de cerebro de equinos, cloroformada según método de Kelsler utilizando la misma mezcla para todos los lotes de experimentación comparada, para lo cual se conservó esa vacuna serie R. P. 19 liofilizada, y en heladera (0° a 4° C). Los conejos hiperinmunizados a corto plazo lo fueron en un plazo total de 45 días con 5 dosis. Cinco conejos se hiperinmunizaron por cada vía. La sangría se efectuó a los 9 días de la última dosis.

Otros tres lotes de cinco conejos inmunizados con dos dosis previas subcutánea, intraperitoneal y endovenosa, cuatro meses más tarde, con dos dosis por las mismas vías y sangrados 9 días después para obtener el suero.

Del mismo modo preparamos 6 ovinos a corto plazo en 45 días por las tres vías y otros seis a largo plazo; y seis caballos, uno (N° 7) completado en 55 días con seis dosis intramusculares, otro (N° 8) inmunizado con dosis intramusculares y sobrecargado, cuatro meses después, con una sola dosis y sangrados a los 8 y 15 días de la hiperinmunización.

El caballo N° 7 ocho meses más tarde es sobrecargado con una dosis masiva de 200 mlts de antígeno y sangrado ocho días después nos da el título máximo neutralizante obtenido (ver el cuadro).

Otros cuatro caballos son hiperinmunizados a corto y largo plazo por vía intradérmica y sangrados 9 y 18 días después.

PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN

Nuestros virus de prueba fueron emulsionados de cerebro de conejo virulento al 20 % en peso, en solución fisiológica, dejado decantar en tubo de ensayo puesto en la heladera durante 24 horas. Retirado el sobrenadante diluído al 1/150 se utilizó a 0,30 ml como dosis mínima infectante según titulación.

Mezclábamos 0,30 ml. de dilución 1/25 o sea 6 dosis mínimas mortales (d. m. m.) frente a 0,1 ml. diluciones crecientes del antisuero problema, en dedales de vidrio, 1/2 hora a 37°. El total de 0,40 ml. era inoculado intracerebral a conejos de 2 kgs. Cada serie de 8 a 10 conejos la completábamos con otros de control inoculados con 2 d. m. m. del mismo virus

llevado a volumen de 0,30 ml. con suero normal equino, de conejo, de ovino o de fisiológica.

Los conejos sobrevivientes fueron observados durante 30 días.

Damos como título la cantidad menor de suero que neutralizó las 6 d. m. m. Presentamos, en un cuadro, el resumen de los sueros preparados y los títulos obtenidos.

Se observa que los conejos y los equinos fueron los mejores seroproductores y los ovinos los peores. En los equinos la vía intradérmica dió sueros del mismo título que la intramuscular aunque a largo plazo, se logró, por vía intramuscular, en el equino N° 7, un suero de un muy alto título neutralizante ya que con 1/60.000 de ml. neutralizó 6 d. m. m. para el conejo.

NEUTRALIZACIÓN CON VIRUS FIJO PASTEUR

En un control realizado con igual técnica, pero mezclando sueros de los equinos N° 7 y 10 con virus fijo (I. B. 4) de origen de rabia canina neutralizó hasta 1/10.000.

RESUMEN

Los autores han realizado un control comparado de obtención de suero antirrábico en equinos, ovinos y conejos, hiperinmunizados con virus cloroformado de rabia paralítica de los bovinos, fijado por pasajes sucesivos intracerebrales en caballos y conejos, e inoculados a corto y largo plazo, por vías subcutáneas, intraperitoneal, endovenosa e intradérmica.

La titulación de los sueros, realizada por neutralización in vitro del virus fijo frente a diluciones del suero, e inoculación intracraneal a lotes de conejos. Los más altos títulos fueron dados por los sueros de equino, algo menores por los conejos y resultaron muy inferiores los de ovinos.

En equinos lograron así, a corto plazo de preparación sueros que neutralizan 6 d. m. m. con 1/10.000; 1/30.000 y a largo plazo, en un equino, hasta con 1/60.000 de ml.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont fait un contrôle comparatif, pour l'obtention de serums antirabiques, sur des chevaux, des moutons et des lapins, avec du virus chlorophormé de rage paralytique des bovidés, fixé par des passages successifs intracerebrales sur des chevaux et des lapins. Ces immunisations

furent faites a court et long délai par voies subcutanée, intraperitoneale, intraveineuse et intradermique.

La titulation des serums obtenus fut faite par neutralisation in vitro du virus fixe, par des dilutions du sérum et inoculation intracerebrale a des lapins.

Les plus hauts titres furent donnés par les chevaux, un peu moins actifs par les lapins, et tres inferieurs chez les moutons.

Les auteurs ont ainsi obtenu sur des chevaux, a court délai de préparation, des serums qui neutralisent 6 d. m. m. avec 1/10.000 de ml. et jusqu'a 1/30.000; et sur un cheval a long délai ils ont obtenu un serum titre 1/60.000.

SUMMARY

The authors have carried out a comparative test for the obtention of antirabic serum in horses, sheep and rabbits. Hiperimmunization was obtained by short and long term inoculations of chloroformed bovine paralytic rabies virus, fixed by successive intracerebral passages in horses and rabbits, and using the subcutaneous, intradermic, intraperitoneal and intravenous routes.

The titres of the serums were established by «in vitro» neutralization. Rabbits were inoculated intracerebrally with mixtures of constant doses of fixed rabies virus and dilutions of the serums.

The highest titres were obtained with horses serums. Rabbits furnished serums of a slightly lower titre, but sheeps serum was of a much lower value.

The serum of horses prepared by short term hiperimmunization neutralized 6 letal (m. l. d.) doses of fixed virus in 1/10.000 of ml. to 1/30.000, and from one horse prepared by long term hiperimmunization a serum of a titre of 1/60.000 was obtained.

DOSIS DE ANTISUERO ENSAYADAS mL x	C O N E J O S												
	Hiperinmunización a corto plazo												
	Subcutánea					Intraperitoneal					Endovenosa		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	22	023	024
0,1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
0,01	S	S	S	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S
0,001	M	S	M	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S
0,0001	M	M	M	M	M	S	M	S	S	S	M	M	S
0,00001	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
0,000001	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

x La serie de números que figuran a lo largo del cuadro identifican los animales
S sobrevivientes

M muertos

I primera sangría

II segunda sangría

(1) En estas pruebas, los conejos que reciben suero 10^{-5} y 10^{-6} mueren 3 y 4 días

(2) El caballo N° 7 en control de reajuste del título dió 1/30.000 y el mismo hiperin

SUEROS ANTIRRABICOS

									OVINOS									
Hiperinmunización a largo plazo									Hiperinmunización a corto plazo					Hiperinmunización largo plazo				
Subcutánea			Intraperitoneal		Endovenosa				Subcutánea		Intraperitoneal		Endovenosa	Subcutánea		Intraperitoneal		Endovenosa
17	18	24	25	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	—	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	—	
S	S	S	S	S	S	S	S	M	M	S	M	M	S	S	M	M	—	
S	S	S	S	S	S	S	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	—	
M	M	S	S	S	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	—	
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	—	
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	—	

eroproductores utilizados.

después que los conejos testigos del lote.
 guizado 8 meses más tarde 1/60.000.

E Q U I N O S

Hiperinmunización a corto plazo			Hiperinmunización a largo plazo		
Intra- musc.	Intradér- mica		Intra- musc.	Intradérmica	
I II 7	I II 11	I II 12	I II 8	I II 9	I II 10
S S	S S	S S	S S	S S	S S
S S	S S	S S	S S	S S	S S
S S	S S	S S	S S	S S	S S
S S(2)	S S	M M	S S	S S	S S
M M	M M	M M	M M	M M	M M(1)
M M	M M	M M	M M	M M	M M

BIBLIOGRAFIA

1. BABES y LEEP, *Ann. Inst. Past.* 1889, 3, 384.
2. TIZZONI y CENTANNI, *Atti della Reale Accademia delle Scienze di Bologna.* Febr. 1895.
3. A. MARIE, *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, 19, 1-1908, 22, 271.
4. C. FERMI, *Centralb. fur Bact.* 1909, 52, 576.
5. G. PROCA, S. BABES y D. JONNESCO. *C. R. Soc. Biol.* . . París, 1934, 115, 1001; 1934, 115, 1313; 1935, 117, 133; 1935, 118, 729.
6. KARL, HABEL, *Public Health Reports.* 1945, 60, N° 20, 545.
7. J. DODERO, *Ann. Inst. Past.* 1937, 59, 382.
8. L. CRUVEILHIER y CH. VIALA, *Ann. Inst. Past.* 1937, 59, 207.
9. L. CRUVEILHIER, P. LEPINE y CH. VIALA, *Ann. Inst. Past.* 1938, 61, 187.
10. L. WEBSTER y J. R. DAWSON J., *Imm.* 1936, 29, 75.
11. B. M. LYON, L. REDDIN y V. R. WOODMAN, *Vet. Med.* 1940, 35, 310.
12. A. W. PONOMAREFFY, *N. N. Solovieff Ann. Inst. Past.* 1928, 49, 1616.
13. W. KUBES y F. GALLIA, *J. Comp. Med.* 1944, 8, 45.