

ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE, CEPAS SURAMERICANAS I: PREPARACION DE UNA VACUNA INACTIVADA Y SU EVALUACIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO

Eastern Equine Encephalitis, South American Strains I: Inactivated Vaccine Preparation and Testing in Small Laboratory Animals

Julieta de Siger¹, Elvira Pulgar¹, Gladys Medina-Gutierrez¹, Irineo Matheus¹ y Mario Perez-Barrientos²

¹*Sanidad Animal. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, estado Aragua. Venezuela.*

²*Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracaibo, estado Zulia. E-mail: jcsiger@cantv.net*

RESUMEN

En virtud de la ausencia de vacunas autóctonas contra el virus de encefalitis equina del Este (EEE) y el uso indiscriminado de vacunas importadas elaboradas con cepas que tienen un comportamiento antigénico, clínico, epidemiológico y molecular diferentes a las cepas aisladas en Venezuela, conllevó a la preparación de una vacuna con cepas autóctonas de EEE para la inmunización de équidos. En su producción se evaluaron tres cepas virales: El Delirio, La Trinidad y Tucacas. Los sustratos de producción empleados fueron: cerebro de ratón lactante (CRL), embriones de pollo (EP) y células VERO (CV). Se utilizaron dos inactivantes: Bromo - etilenimina (BEI) y Formaldehído. Una vez producido el virus, se determinó: la carga viral, el proceso de inactivación, así como la inocuidad y la potencia. Los resultados obtenidos indicaron efectividad en la replicación viral en todos los sustratos y cepas evaluados. La acción del BEI sobre la cepa El Delirio no funcionó, al no producirse inactivación completa del mismo. El formol inactivó el 100% de las cepas La Trinidad y Tucacas en CV, mientras que en EP, la inactivación fue del 33,3%. Las pruebas de inocuidad y potencia resultaron satisfactorias en el 100% de las vacunas producidas en CV. Estos resultados indican que el mejor sustrato para la elaboración de vacunas inactivadas son los cultivos celulares, al obtener una mayor masa antigénica y una mejor eficiencia del inactivante. También se observó que los controles de inocuidad y potencia solo pudieron lograrse al obtener una inactivación del virus en un 100%.

Palabras clave: Encefalitis equina del este, cepas suramericanas, vacunas inactivadas, equinos, cepas venezolanas, formaldehído.

ABSTRACT

The absence of autochthonous Eastern Equine Encephalitis (EEE) virus vaccine and the indiscriminative use of foreign strain vaccines, with marked differences (antigenic, molecular, epidemiological and clinical) as compared to those isolated in Venezuela lead to the elaboration of a vaccine with EEE autochthonous strains to immunize equidae. Three viral strains (El Delirio, La Trinidad and Tucacas) were tested during the preparation of this vaccines; they were produced in suckling mice brains (SMB), whole chicken embryo (WCE) and Vero cell (VC) substrates. Two inactivating substances, Bromo - etilenimine (BEI) and formaldehyde were used. Once the virus were prepared, the virus had inactivation process, safety and potency. The results showed an efficacy in the virus replication for all used substrates and strains. The action of BEI on the El Delirio viral strain did not provoke a complete inactivation of this strain. The formaldehyde inactivated 100% of the strains La Trinidad and Tucacas in CV and 33.3% in WCE substrates. The safety and potency test were satisfactory in 100% of the vaccines made with CV. These results showed as the best, the cellular cultures because they are able to gather a higher antigen load and better efficacy from the inactivated substance. It was also shown that safety and potency controls were only achieved in 100% inactivated virus.

Key words: Eastern Equine Encephalitis, South American strains, inactivated vaccine, Venezuelan horse strains, formaldehyde.

INTRODUCCIÓN

El complejo del virus de la encefalitis equina del este (EEE) pertenece a la familia Togaviridae, genero *alfavirus*. [5].

Pruebas, de cinética de inhibición de la hemoaglutinación permitieron reconocer dos variantes antigénicas: los aislamientos de Norteamérica y las Islas del Caribe, y los aislamientos de Centro y Suramérica [5, 6, 29]. Entre las variantes norteamericanas y suramericanas de EEE existen diferencias: epidemiológicas, de patogenicidad, clínicas y moleculares [3, 5, 11, 24, 26, 27, 29, 30]. Rohering y col, [18], reportan la dificultad de producir anticuerpos monoclonales específicos para las cepas Suramericanas en virtud de lo poco conservado del genoma en las regiones correspondientes a las proteínas estructurales, mientras que las cepas norteamericanas son altamente conservadas para esa región.

En Venezuela, el virus de EEE fue aislado por primera vez, en su ciclo silvestre, de hámsters centinelas durante 1975 y epizooticamente, de equinos en 1976 [20, 28]. Se desconoce aún como el virus irrumpe, del ciclo silvestre al epizootico en el país, sin embargo, los estudios realizados en el laboratorio de Arbovirus del Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV), investigando el pasado, mediante el banco de sueros, y el futuro de una población a riesgo de infectarse con el virus EEE estando el mismo presente o no, es decir, retrospectivamente y prospectivamente al primer aislamiento en equinos, permiten señalar que a pesar de que esta enfermedad es esporádica y estacional, los casos clínicos se han presentado durante todos los meses del año, relacionados probablemente a la presencia de aguas estancadas: lagunas, ciénagas, esteros asociados a vertebrados amplificadores y mosquitos, lo cual permite una amplia distribución del virus de EEE en Venezuela; originando en algunas zonas: **a)** infección y pequeños brotes en équidos, en oportunidades localizados en lugares distantes, apoyada por los resultados de laboratorio, que señalan situaciones endémicas-epizooticas de intensidad variable, sin evidencia clínica-virológica ni serológica que afecte a humanos; y **b)** zonas donde no se evidencian casos clínicos, aún cuando la serología indica actividad viral (endemicidad) [21]. En la primera situación, se recomienda la protección de los equinos pertenecientes a zonas de riesgo, donde se detecte actividad epizootica al igual que los equinos de deporte (por su frecuente movilización y alto valor económico) [22]. Las vacunas autorizadas han sido inactivadas monovalentes de EEE o bivalentes de encefalitis equina venezolana (EEV) y EEE; todas han sido elaboradas con cepas del subtipo norteamericano (SNA) de EEE, desconociéndose la eficacia y duración de inmunidad conferida por esas vacunas con respecto a las cepas virales de EEE actuantes en Venezuela. Trabajos previos sobre la efectividad de las vacunas elaboradas con cepas del SNA utilizadas en la protección de humanos expuestos a riesgo o epizootias causadas por el mismo subtipo, mostraron una mayor reactividad con sus homólogos SNA y en menor grado con los del subtipo suramericano (SSA), [1, 4, 9, 14, 25].

Otras de las consideraciones menos probable pero no imposible de suceder, respecto al uso de vacunas elaboradas con cepas de las variedades norteamericanas (mas patogénicas para equinos y humanos), que de darse las condiciones favorables

como el incremento del número de vectores eficientes, pudiera establecerse un foco enzoótico de la variedad norteamericana y originarse eventos epizooticos/epidémicos, causando alarma a las autoridades de salud pública y animal [2, 10].

Finalmente, las dificultades que pudieran presentarse en los controles de potencia al enfrentar los animales vacunados con cepas SNA y evaluarlos serológicamente con variedades diferentes a las de la elaboración de las vacunas, conllevan al rechazo de lotes de vacunas, los cuales habiendo cumplido con los controles en su país de origen, los mismos no soportan el desafío con cepas actuantes en el país.

Experiencias con lotes de vacunas evaluadas en el laboratorio de Referencia para el control de calidad de vacunas contra Encefalitis Equina del Este (laboratorio de Arbovirus del IIV) lo han demostrado, resultando en el rechazo de al menos 01 lote de vacunas importadas monovalentes (Cuba) y 2 lotes bivalentes (USA) habiendo éstas, pasado los controles de calidad en su país de origen. (Datos no publicados)

El presente estudio resume los diferentes ensayos realizados para la selección preliminar de la cepa vacunal, sustrato de producción viral, inactivantes y los controles de seguridad evaluados en animales de laboratorio, a fin de obtener una vacuna monovalente inactivada autóctona contra EEE que de protección a los équidos y disminuir la dependencia de importación de vacunas contra las Encefalitis equinas en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus. Tres cepas de virus EEE fueron utilizadas: El Delirio, La Trinidad y Tucacas, todas aisladas de cerebro de equinos con signos clínicos de encefalitis (TABLA I).

Sustrato de producción de virus

Ratones Lactantes: Ratones de tres días de edad fueron inoculados por la vía IC con 25 uL de suspensión de CRL en solución tamponada de fosfatos más 10% de bovoalbúmina. Este sustrato fue utilizado únicamente con la cepa EL Delirio y con BEI como inactivante.

Embriones de pollo (EP): Se siguieron las recomendaciones de la Conferencia Internacional sobre Vacunas Contra Encefalitis Equina [19]. Este sustrato se utilizó exclusivamente para la cepa **La Trinidad**.

Células Vero (CV): Las cepas de los virus de EEE **La Trinidad y Tucacas** fueron inoculadas en la línea continua de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) crecidas en monocapa en frascos Roux usando medio de crecimiento MEM con 5% de suero fetal bovino. Se realizaron pases seriados en CV y EP y titulaciones simultáneas a la inoculación y recolección para apreciar la multiplicidad del inóculo en el sistema celular y cantidad de virus producido.

TABLA I
VIRUS DE EEE SELECCIONADOS PARA LA ELABORACIÓN DE LA VACUNA

Virus	Localidad (1)	Fuente	Pasaje (2)	Año aislamiento
El Delirio (3)	Zulia-Sta. Cruz	Cerebro Equino	CRL ₅ IP ₅ CRL ₂ E ₅	1976
La Trinidad	Zulia-Sta. Cruz	Cerebro Equino	CRL ₂ V ₁ -V ₅	1976
Tucacas	Falcón-Tucacas	Cerebro Equino	CRL ₄ V ₁ , CRL ₅ V ₁ CRL ₅ IP ₁ V ₁	1984

Detección y titulación viral

Para la detección de virus vivo residual fueron inoculadas entre 4 y 10 camadas de ocho ratones blancos suizos de tres días de edad (RL) con 25 mL por las vías intracerebral (IC) más subcutánea (SC) simultáneamente, puro y en dilución 1:10. Estos controles fueron realizados durante los procesos de inactivación, inocuidad y potencia. Para medir la cantidad de virus utilizada en las pruebas de potencia y multiplicidad viral, se realizaron titulaciones simultáneas de los virus, utilizando siete camadas de seis ratones blancos suizos de tres días de edad con 25 mL vía intracerebral (IC) disociadas 1 hora a 4°C y diluciones Log. base 10. El cálculo de la dosis letal cincuenta por ciento ratón lactante intracerebral por mL (DL₅₀%RLIC/mL) se realizó por el método de Reed-Muench. [17]. El período de observación de los animales en las pruebas para la detección viral, titulación simultánea, control de inactivación, inocuidad y potencia fue de 10 días; los ratones enfermos o muertos se sometían a la técnica de fijación de complemento para la identificación de virus.

Fijación de Complemento

Se utilizó el micro método en pruebas 100% de hemólisis. Diluciones de antígenos crudos (suspensión de CRL en solución salina fisiológica) y la adición de líquido ascítico inmune para EEE y EEV más dos unidades de complemento, incubación durante la noche a 4°C, al día siguiente se agregaba el sistema hemolítico y se incubaron una hora a 37°C.

Inactivantes

Bromo-Etilenimina: Etilenimina binaria producida en solución alcalina fue usada al 1,0% y 1,5% exclusivamente sobre la cepa **El Delirio** producida en CRL y usada en suspensión viral al 10%. La acción del BEI fue usada sobre dos alícuotas de la cepa el Delirio a diferentes tiempos y temperatura (TABLA V). La tasa de inactivación viral fue calculada mediante titulación simultánea al inicio del ensayo.

Formol: Se utilizó formaldehído diluido a partir de formol al 37% sobre las cepas La Trinidad (producida en EP y CV) y Tucacas (en CV.) Las concentraciones usadas sobre la cepa La Trinidad producida en EP estuvieron comprendidas entre

TABLA II
CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE INACTIVACIÓN PARA LAS CEPAS DE EEE

Cepa viral	Formaldehído %	Tiempo de inactivación 37°C/horas
La Trinidad -EP	0,4	72
La Trinidad -CV	0,05	24
Tucaras -CV	0,05	24

0,5% y 0,05% en tiempo y temperaturas variables (TABLA II). Todos los virus producidos en CV se inactivaron con formol al 0,05% /24 horas /37°C.

Para evaluar la inactivación de las suspensiones virales se colectaron muestras a las 18 y 24 horas a 37°C y a las 12, 18 y 36 horas una vez cambiadas a 4°C; alícuotas de estas muestras fueron inoculadas en RL por las vías IC más IC y SC simultáneamente. Controles de esterilidad fueron realizados en todas las etapas de producción, generalmente usando tioglicolato y sabouraud, e incubados a 37°C. En la preparación de las semillas se incrementó el número de medios de cultivo, utilizándolos en forma de líquidos y sólidos, tales como agar sangre, gelosa nutritiva, McConKey y caldo simple.

Preparación de las vacunas

La vacuna elaborada con la cepa la Trinidad de EEE en EP y controlada según las recomendaciones de la Conferencia Internacional sobre Vacunas Contra Las Encefalitis Equinas (CISVEE) [19], fue preparada con el pase CRL₂E₅, utilizando embriones de 10-11 días de edad inoculándose 0,1 mL de una suspensión viral que contenía 100.000 DL₅₀%RLIC / mL por la vía alantoidea. El título obtenido a partir del pase CRL₂E₅ fue de 10^{10,6} DL₅₀%RLIC/mL. Los embriones fueron triturados y suspendidos en buffer fosfato glicerinado, pH 8,0, las suspensiones de los embriones cosechados fueron centrifugados y el sobrenadante obtenido fue inactivado con formol al 0,4% durante 72 horas a 37°C con agitación continua. Después de la inactivación

para la obtención de la vacuna, se le practicaron controles de esterilidad, inocuidad y potencia en animales de laboratorio.

Las vacunas elaboradas en CV fueron: 1) Tres lotes elaborados con la cepa Tucacas y 2) cuatro lotes preparados con la cepa La Trinidad (TABLA III), todos los lotes fueron producidos en frascos Roux. Para ello, se inoculó la suspensión viral en monocapa de CV, y en adsorción por 1 hora a 37°C, luego se cubrieron las células con medio MEM con 2% de suero fetal bovino. Los cultivos fueron chequeados dos veces al día hasta obtener efecto citopático $\geq 75\%$. Las suspensiones virales a partir de las CV fueron cosechadas, clarificadas por centrifugación, inactivadas y se realizaron controles de esterilidad y seguridad en animales de laboratorio.

Prueba de inocuidad y de potencia

Se siguieron las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Vacunas sobre Encefalitis Equinas (CIVSEE) [19].

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, apoyados en tablas; para las titulaciones virales se aplicó el método de Reed-Muench y para las pruebas de inocuidad y potencia se siguieron las normas CISVEE [19]. Se utilizó la prueba de VARIANZA para analizar: diferencias entre los diferentes pasajes de las cepas utilizadas, así como también la Prueba UNIVARIANTE para analizar la acción del BEI en las diferentes condiciones. Para las pruebas de potencia se desarrolló el método de FISHER.

RESULTADOS

Sustratos y replicación viral

La TABLA IV muestra los resultados obtenidos de la replicación viral en los diferentes sustratos. Se observa que la cepa La Trinidad producida en EP y El Delirio producida en CRL, generan mayores cantidades de virus al compararse con la producción generada en las CV. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con la producción de virus en CV, se apreció que no existen diferencias significativas entre ellos (cepas y sustratos). Este resultado permite inferir que la producción de virus utilizando estos sustratos es suficiente para la producción de vacunas inactivadas según las recomendaciones de la CISVEE [19] y otros investigadores [15,16]. Es importante señalar que en función de manejo, practicidad, éxito en la inactivación así como también las reacciones anafilácticas que se puedan producir por tejidos extraños a la especie a inmunizar, es recomendado el uso de tejidos celulares como sustrato para la elaboración de vacunas.

Inactivantes

Bromo-etilenimina (BEI): Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados con BEI, reflejan que en ninguno de ellos hubo inactivación viral total. La tasa de inactivación

TABLA III
TITULOS PRELIMINARES DE LOS VIRUS DE EEE
PARA LA ELABORACIÓN DE LAS VACUNAS

Lotes preliminares	Pasaje	Título (DEX)
Cepa tucacas		
I	CRL ₄ V ₁	10,1
II	CRL ₅ V ₁	9,7
III	CRL ₆ RAIPV ₁	8,9
Cepa la trinidad		
I	CRL ₂ V ₁	9,2
II	CRL ₃ V ₂	9,1
III	CRL ₄ V ₁	9,3
IV	CRL ₆ V ₁	10,2

Dex: Abreviatura del exponente decimal del logaritmo base 10 de un número. Haldane, J.B.S. "Orden de magnitud". Nature 187:879, 1960. (CRL): Cerebro de ratón lactante; (RA): Ratón adulto; (V): VERO.

TABLA IV
REPLICACIÓN VIRAL DE LAS CEPAS DE EEE
POR SUSTRATO

Cepa	Sustrato	DL50%RLIC / mL (DEX)
El Delirio	CRL	9,8 – 11,1
La Trinidad	EP	9,5 – 11,3
La Trinidad	CV	8,4 – 10,2
Tucacas	CV	8,9 - 10,6

estuvo comprendida entre $10^{2,0}$ y $10^{5,4}$ (TABLA V). Considerando, los tiempos de exposición del BEI (no mayor de 29 horas a 37°C) sobre la suspensión viral elaborada a partir de CRL, posiblemente el BEI requiere un mayor tiempo de acción para la inactivación completa para este tipo de sustrato. A pesar de la existencia de métodos para la clarificación de los sobrenadantes, generalmente con este tipo de sustrato, quedan pequeños restos de detritus celulares que podrían limitar la acción del inactivante. Al realizar el análisis estadístico se encontró diferencias significativas al 5% cuando fue utilizado BEI al 1,0% y 1,5% a 37°C y adicionalmente 24 horas a 4°C; a 37°C no hubo diferencias significativas entre los diferentes porcentajes del BEI. Se observó que al utilizar BEI al 1,0% luego de 29 horas de exposición sobre la suspensión viral a 37°C, el título disminuyó 5,6 DEX con respecto al control que fue de 9,5 DEX; mientras que cuando se utilizó BEI al 1,5% luego de 28 horas de exposición a 37°C, el título disminuyó 2,9 DEX con respecto al control.

Formaldehído: El uso de formaldehído sobre las suspensiones de embriones para la producción de vacuna de EEE cepa La Trinidad-EP, tuvo un comportamiento variable; solo dos de los seis ensayos realizados fueron satisfactorios a la inactivación. Se observa la influencia de la temperatura y el tiempo

TABLA V
EFFECTO INACTIVANTE DEL BROMO-ETILENIMINA SOBRE EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE,
CEPA "EL DELIRIO"

Ensayos	BEI%V/V (1)	Resultados (DL ₅₀ %RLIC/ML) (DEX)			
		Tiempo horas	Control virus	37°C	37°C+24 horas en Nevera (2)
1	1,0	0	9,5		
		5		7,1	4,9
		24		4,6	4,3
		29		3,9	4,5
2	1,5	0	8,3		
		4		4,5	5,0
		24		5,8	6,3
		28		5,4	4,9
3	1,5	0	9,2		
		3		8,6	≥ 7,5
		6		≥ 7,0	≥ 7,5
		18		≥ 7,5	7,0
		24		≥ 7,5	5,4

1. Porcentaje en volumen/volumen del bromo-etilenimina.

2. Resultados de alícuotas de los diferentes períodos a 37°C y adicionalmente 24 horas en nevera. P<0,05.

TABLA VI
INACTIVACIÓN DEL VIRUS EEE, CEPA LA TRINIDAD-EP POR FORMALDEHIDO EN DIFERENTES CONDICIONES

Lote	Pasaje/Titulo	Formaldehído %	Temperatura °C	Tiempo Horas	Resultados
1	CRL2, EMB 5 12,0	0,5	22	68	No satisfactorio
2	CRL2, EMB 5 10,6	0,05	25	72	No satisfactorio
3	CRL2, EMB 5 10,8	0,4	37	72	SATISFACTORIO
4	CRL2, EMB 5 10,8	0,4	24	72	No satisfactorio
5	CRL2, Emb 5 10,6	0,4	37	72	SATISFACTORIO
6	CRL ₂ Emb 6 9,8	0,4	37	24	No satisfactorio

de acción a las diferentes concentraciones del formaldehído (TABLA VI). Ninguno de los ensayos en los cuales se utilizaron temperaturas inferiores a 37°C produjo inactivación ni aún con concentraciones más altas de formol ni tiempos de exposición menores de 68 horas; lo que infiere que las suspensiones virales de EP requieren un mayor tiempo de acción del formaldehído para producir la inactivación completa del virus, lo cual se manifiesta en los lotes 3 y 5 de la TABLA VI.

Los resultados obtenidos en los procesos de inactivación para las cepas La Trinidad y Tucacas elaboradas en CV resultaron satisfactorios al inactivarlos con formaldehído al 0,05% a 37°C durante 24 horas.

Los controles de esterilidad resultaron satisfactorios para las vacunas elaboradas con las cepas La Trinidad en EP y en CV, así como para los lotes de vacunas cepa Tucacas-CV.

Pruebas de inocuidad y potencia en animales de laboratorio

Pruebas de inocuidad de la cepa EEE-La Trinidad en EP: Los resultados obtenidos a partir de seis lotes de vacuna elaboradas en EP para la cepa La Trinidad de EEE, señalan que dos resultaron satisfactorios para las pruebas de inocuidad utilizando: RL inoculados por la vía IC más SC, pollitos recién nacidos (PRN) y cobayos adultos jóvenes. Ninguno de ellos mostró signos de enfermedad ni muerte, hubo 100% de sobrevivencia.

Prueba de Potencia de la vacuna EEE-La Trinidad en EP: Los resultados obtenidos para la prueba de potencia utilizando cobayos adultos jóvenes resultaron satisfactorios para los dos lotes inactivados (3 y 5), observándose que de 10 cobayos vacunados por lote con la cepa La Trinidad-EP, todos sobrevivieron, mientras que los cobayos testigos (4/lote) expuestos con 80 dosis y 125 dosis RLIC respectivamente, todos fallecieron en el tiempo esperado (seis y medio días).

Prueba de inocuidad de la vacuna EEE-La Trinidad en CV: Cuatro lotes con títulos comprendidos entre $10^{9,1}$ a $10^{10,2}$ resultaron satisfactorios en las pruebas de inocuidad evaluadas en RL, PRN y cobayos. No se observaron efectos deletéreos en ninguno de los animales inoculados con la cepa del complejo EEE La Trinidad elaborada en CV.

Prueba de potencia de la vacuna EEE-La Trinidad en CV: Fueron evaluados en cobayos jóvenes, tres de los cuatro lotes elaborados en CV y los resultados fueron satisfactorios en dos de los tres lotes evaluados (TABLA VII) donde se aplicaron 25.120 dosis y 2.500 dosis; en el desafío sobrevivieron los vacunados y fallecieron los controles en el primer caso 100%, en el segundo 75%, y en el tercer grupo sobrevivieron los vacunados y testigos, ya que la dosis del reto fue menor de 10 dosis.

Vacuna de EEE cepa Tucacas elaborada en células vero

Controles de inocuidad y potencia de la vacuna EEE-Tucacas en CV. Prueba de Inocuidad: Tres lotes de vacuna con títulos entre $10^{8,9}$ y $10^{10,1}$ evaluados en RL IC +SC ,RLIC, PRN SC y cobayos IC fueron satisfactorios. Prueba de Potencia: Dos de tres lotes de vacuna resultaron satisfactorios en la prueba de potencia en cobayos adultos jóvenes. Los animales

vacunados sobrevivieron mientras los testigos murieron al ser retados con 10.000 DL50%RLIC y 7.943 DL_{50%} RLIC de la cepa homóloga. En el tercer lote evaluado sobrevivieron los vacunados y controles cuando fueron retados con 2,5 DL_{50%} cobayo. La TABLA VIII muestra los resultados de las pruebas de inocuidad y potencia.

Los controles de esterilidad realizados en los diferentes medios de cultivo resultaron todos satisfactorios.

La evaluación estadística de las pruebas de potencia de las vacunas La Trinidad y Tucacas, elaboradas en CV reveló valores de significancia en la prueba de Fisher igual a 0,011 y 0,001 respectivamente, estos valores son altamente significativos.

DISCUSIÓN

El uso de vacunas para la protección de los animales contra las Encefalitis equinas es de gran interés en la salud pública y veterinaria al ser estas enfermedades zoonóticas, que se inician en los équidos y posteriormente afectan a los humanos. Trabajos realizados por Cole [7]; Mussgay y col. [12]; White y col. [31] en la elaboración de vacunas inactivadas contra Encefalitis equina y otros alfavirus han utilizados cultivos primarios y líneas celulares en monocapas estáticas y en suspensión celular. En la elaboración de una vacuna autóctona contra EEE, se utilizaron varios tipos de sustratos para seleccionar aquel que proporcionara mejores beneficios con respecto a producción viral, manejo en la elaboración, inactivación completa y ningún efecto deletéreo sobre los animales de experimentación. Los resultados obtenidos permiten inferir que posiblemente el BEI no sea un buen inactivante cuando el sustrato que se utilice sea EP o CRL, o que este inactivante requiera de un mayor tiempo de acción sobre los sustratos para ejercer su acción inactivante. Asimismo, la acción inactivante del formol sobre las suspensiones de embriones de la cepa la Trinidad se vio limitada ya que de 6 lotes, solamente 2 resultaron satisfactorios. El análisis de estos resultados sugiere la protección del virus de la acción del formol por estar enmascarado intracelularmente o en detritus celulares (citado por Cole jr, y col [8]). Se conocen casos de infecciones en humanos y/o

**TABLA VII
RESULTADOS DE PRUEBAS DE POTENCIA CEPAS EEE LA TRINIDAD-CV EN COBAYOS**

Lotes de vacuna EEE La Trinidad en CV Lote	Pase	Título (DEX)	Resultados
I	CRL ₂ V ₁	9,2	El 70% de los cobayos vacunados mostraron títulos de anticuerpos IHA para EEE y todos sobrevivieron al reto con 25 120 DL50%RLIC. Todos los testigos (100%) fallecieron después del reto y se confirmó positividad a EEE por FC.
II	CRL ₃ V ₂	9,1	No se realizó potencia
III	CRL ₄ V ₁	9,5	Todos los cobayos vacunados sobrevivieron después del reto con 2500DL50%RLIC. Los cobayos testigos fallecieron 3 / 4 (75%) y se confirmó el aislamiento viral por FC.
IV	CRL ₆ V ₁	10,2	Todos los cobayos vacunados y testigos sobrevivieron. Pocas dosis en el desafío.

TABLA VIII

RESULTADOS Y PRUEBAS DE INOCUIDAD Y POTENCIA EN ANIMALES DE LABORATORIO EN TRES LOTES DE VACUNAS INACTIVADAS EEE – TUCACAS EN CV

Lote	Inocuidad					Potencia					
	Número de animales y vía de inoculación					Número Cabayos y vía de inoculación					
	RLIC+SC	RLIC	PRN SC	Cobayos IC	RI	Intervalo		(Días) entre		Vacunación y Reto	
						V	C	V	C	RETO Y R/D	
I	32	72	20	5	S	10SC	4	10SC	4	14IC/4/2/5	N.S
						0		7		14	
II	84	NR	20	10IC	S	15SC	5	15SC	5	30	S
				10IM		10 IM		10		IC/10.000	
						0		21 Días	21 Días	Despues II Dosis	VAC.
III	32	32	20	2	S	10SC	4	10SC	4	14IC/7943	S
						0		14		DOSIS	
										28 Días Despues II Dosis	

RI: Resultado de Inocuidad. RP: Resultado Potencia. NR: No realizado. S: Satisfactorio. NS: No Satisfactorio. RLIC+SC: Ratón lactante intracerebral más subcutáneo RLIC: Ratón lactante intracerebral. PRN: Pollitos recién nacidos. IC: Intracerebral. SC: Subcutáneo. IM: Intramuscular. R/D:Nº retardados/dosis del reto. V: Vacunados. C: Controles.

animales después de aplicar vacunas contra EEV inactivadas (evaluada y en uso) con formol y producida en EP causaron el 4,6% (14) de infecciones en 327 humanos vacunados [23]. Otros investigadores señalan que el uso del formol a mayores concentraciones sobre las suspensiones del embrión en su forma directa, simple, sin aditivos (detergentes, adyuvantes) puede repercutir sobre la potencia protectora, degradando el tamaño de los componentes que contienen los determinantes inmunogénicos [12, 13].

Los virus producidos en CV resultaron inactivados utilizando formol al 0,05% en menos de 24 horas a 37°C. La preparación de la vacuna en medios de cultivo celular es más susceptible a la inactivación del virus, resultando menos probable la presencia de virus vivo residual que en las vacunas preparadas en EP o en cualquier otro tejido animal además, tiene como ventaja la ausencia de proteínas heterólogas a la especie a inmunizar y bien manejada favorece la conservación de la antigenicidad [7, 8]. Investigaciones previas utilizando cepas del subtipo norteamericano (SNA) inactivadas con formol al 0,4% durante 72 horas a temperaturas entre 18-20°C y entre 7-10°C, produjeron buenos resultados [15, 16]. Trabajos realizados por Cole y col. [8] elaborando vacunas contra EEV, utilizó fibroblastos de pollo inactivando el virus con formaldehído al 0,1% y 0,05% a 37°C durante 6 y 8 horas y 8 y 10 horas respectivamente, resultando excelente protección con ambas concentraciones de formol. Así mismo, trabajos realizados por Cole Jr [7] usando virus EEE en fibroblastos de pollo crecidos en frascos en rotación reportó la inactivación con formol al 0,05% y 0,1% a 37°C. Estudios realizados

por Cole, Jr. [7], Cole y col. [8] y Mussgay y col. [12] apoyan los resultados obtenidos en esta investigación.

Diferentes inactivantes pueden ser usados en la elaboración de vacunas contra los *alfavirus*, sin embargo, es importante considerar la temperatura y tiempo de inactivación, naturaleza del inactivante, protección y procesamiento del antígeno.

CONCLUSIONES

1. Al evaluar la producción de virus de EEE en CRL, EP y CV, aún cuando los dos primeros tejidos produjeron mayor cantidad de virus, este beneficio se disminuye frente a los problemas que causan los tejidos más organizados como son: a) detritos celulares que pueden contener virus sin inactivar y pudieran liberarse cuando ya el producto está en circulación conllevando a la producción de enfermedad, b) proteínas heterólogas a la especie a inmunizar que pudieran causar reacciones anafilácticas, c) manejo más laborioso con las consecuencias de mayor costo de producción, posibles contaminantes, pérdida de masa antigénica por procesos de clarificación y filtración, dificultad para la inactivación. Los resultados obtenidos revelaron que solamente dos lotes de vacuna, producidos en EP, resultaron satisfactorios frente a los 6 lotes de vacuna producidos en CV.
2. Como inactivante se seleccionó el formol, ya que utilizado en condiciones de temperatura, pH y tiempo de inac-

tivación apropiados, produjo la inactivación completa sobre los virus producidos en cultivos celulares.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la valiosa colaboración prestada por el personal de laboratorio y secretarial de la Sección de Arbovirus, Instituto de Investigaciones Veterinarias, INIA - Aragua.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARTELLONI, P.J.; MCKINNEY, R.W.; DUFFI, T.P.; COLE Jr, F.P. An inactivated Eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick embryo cell culture II. Clinical and serologic responses in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 19(1): 123-126. 1970.
- [2] BERTONE, J.J. Togaviral Encephalitis. In: Reed SM, Bayly, W.M. Eds. **Equine Internal Medicine**. Philadelphia: Saunders, 502-503pp. 1998.
- [3] BRAULT, A.C.; POWERS, A.M.; VILLARREAL - CHAVEZ, C. L.; NAVARRO L., R.; FRAIRE C, M.; LERA - GUTIERREZ, F.; KANG, W.; TESH, R.B.; SHOPE, R.E.; WEAVER, S.C. Genetic and antigenic diversity among Eastern equine encephalitis viruses from North, Central and South America. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61(4): 579-586. 1999.
- [4] CALISHER, CH.H.; LEVY-KOENIG, E.; MITCHEL, C.J.; CABRERA, F.A.; CUEVAS, L.; PEARSON, J.E. Encefalitis equina del Este en la República Dominicana, 1978. **Bol. Of. Sanit Panam** 90(1): 19-31. 1981.
- [5] CALISHER, CH.H.; SHOPE, R.E.; BRANDT, W.; CASALS, J.; KARABATZOS, W.; MURPHY, F.A.; TESH, R.B.; WIEBE, M.E. Proposed antigenic classification of registered Arbovirus. I Togaviridae, Alphavirus. **Intervirolog.** 14: 229-232. 1980.
- [6] CASALS, J. Antigenic variants of Eastern Equine Encephalitis virus. **J. Exp. Med.** 119(4): 547-565. 1964.
- [7] COLE Jr., F.E. Inactivated Eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in rolling bottle cultures of chick embryo cells. **Appl. Microbiol.** 21: 842-845. 1971.
- [8] COLE Jr, F.E.; MAY, S.W.; ROBINSON, D.M. Formalin-Inactivated Venezuelan Equine Encephalomyelitis (Trinidad Strain) vaccine produced in Rolling-Bottle cultures of chicken embryo cells. **Appl Microbiol.** 25(2): 262-265. 1973.
- [9] DIETZ Jr., W.H.; GALINDO, P.; JOHNSON, K.M. Eastern equine encephalomyelitis in Panama. The epidemiology of the 1973 epizootic. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 29 (1): 133-140. 1980.
- [10] FRANKLIN, R.P.; KINDE, H.; JAY, M.T.; KRAMER, L.D.; GREEN, E.N.; CHILLS, R.E.; OSTLUND, E.; HUSTED, S.; SMITH, J.; PARKER, M.D. Eastern Equine Encephalomyelitis virus infection in a horse from California, **Emerging Infect Dis.** 8(3): 283-288. 2002.
- [11] MORRIS, C.D. Eastern equine encephalomyelitis **The Arboviruses. Epidemiology and Ecology.** Cap. 24, Vol. III. In: T.P. Monath (Ed) CRC Press Boca Raton Fla. 1-20pp. 1988.
- [12] MUSSGAY, M.; BERGOLD, G.; WEILAND, E.; UEBERSCHAR, S. Preparation and evaluation of inactivated Venezuelan equine encephalitis vaccines. **Zbl. Vet. Med. B.** 19: 511-517. 1972.
- [13] MUSSGAY, M.; WEILAND, E. Preparation of inactivated vaccines against alphaviruses using SemLiki Forest Virus. White mouse as a model. II Evaluation of formalin-inactivated vaccines treated with Tri (n-butyl) phosphate and or Saponin and Properties of the inactivated virus. **Intervirolog** 1: 269-277. 1973.
- [14] POLANCO, R.; CHAVEZ, P.; FERNANDEZ, A.; VRTIAK, O.J.; KAPITANCIK, B. Importancia de la vacunación en el control de la Encefalomyelitis Equina del Este (EEE) en la República de Cuba. **Folia Veter.** 27(1): 83-89. 1983.
- [15] POLANCO, R.; MOYA, O. Informe de la República de Cuba a la Conferencia Internacional sobre vacunas contra la Encefalitis equina Venezolana y otros virus de Encefalitis equina. Maracay, Venezuela. 11-17 Agosto (Mimeografiado) 6pp. 1974.
- [16] RANDALL, R.; MILLS, J.W.; ENGEL, L. L. The preparation and properties of a purified equine encephalomyelitis vaccine **J. Inmunol** 55(1): 41-52. 1947.
- [17] REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent end points. **Am. J. Hyg.** 27: 493-497. 1938.
- [18] ROEHRING, J.T.; HUNT, A.R.; CRANG, G.J.; SHEIK, B.; BALIN, R.A.; TSAI, T.F.; TRENT, D.W. Identification of monoclonal antibodies capable of differentiating antigenic varieties of eastern equine encephalitis viruses. **J. Gen. Virol.** 75: 2897-2909. 1990.
- [19] SCHERER, W.F.; MACKENZIE, R.B.; HEDDY, G.A.; COLE. J.R.; PEDERSEN, Jr.; C.E.; SPERTZEL, R.O.; JOHNSON, K.M.; TAMOGLIA, T.B., Producción y control de biológicos. **Conferencia Internacional sobre vacunas contra las Encefalitis Equinas.** Organización Panamericana de la Salud. Maracay 11-19 Agosto, 65 pp. 1974.
- [20] SIGER, J. de; METTLER, N.; CASTAÑEDA, J. First Isolation of Eastern encephalomyelitis virus from a horse in Venezuela. **19th Annual Proceedings. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.** Miami Beach, Fl. Nov. 229-236pp. 1976.
- [21] SIGER J. de; PARRA, D.; PEREZ, M.; PULGAR, E.; SANMARTIN, C. Report from the Instituto de Investiga-

- ciones Veterinarias, Sección Arbovirus. **Arthropod-Borne Virus Information Exchange**. 37(3): 194-197. 1979.
- [22] SIGER, J. de; PULGAR, G.E. Encefalitis Equina. Recomendaciones del Instituto de Investigaciones Veterinarias sobre la política de vacunación de equinos contra las encefalitis equinas por Arbovirus existentes en el país. II **Reunión Nacional de Epidemiología Veterinaria**. San Antonio de Los Altos. 22 - 24 Mayo. Venezuela. 363-367pp.1989.
- [23] SMITH D.G.; MAMEY, H.K.; MARSHALL R.G.; WAGNER, J.C. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. Laboratory aspects of fourteen human cases following vaccination and attempts to isolate the virus from the vaccine. **Am. J. Hyg.** 63: 150-164. 1956.
- [24] STRIZKI, J.M.; REPIK, P.M. Structural protein relationships among Eastern equine encephalitis viruses **J. Gen. Virol.** 75: 2897-2909. 1994.
- [25] STRIZKI, J.M.; REPIK, P.M. Differential reactivity of immune sera from human vaccines with field strains of Eastern equine encephalitis virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53(5): 564-570. 1995.
- [26] WALDER, R.; JARLING, P.B.; EDDY, G.A. Differentiation marker of eastern equine encephalitis (EEE) viruses and virulence Vesenjak - Hirsan J; Porterfield, J.S.; Arslanagic, E. Eds. **Arbovirus in the Mediterranean Countries**. Zentralbe, Bakt. Suppl 9. New York: Gustav Fisher Verlag. 237-250pp. 1980.
- [27] WALDER, R.; ROSSATO, R.R.; EDDY, G.A. Virion Polypeptide heterogeneity among virulent and avirulent strains of eastern equine encephalitis (EEE) virus. **Arch Virol.** 68: 229-237. 1981.
- [28] WALDER, R.; SUAREZ, O.M. Primera evidencia en Venezuela de la Encefalitis Equina del Este (EEE) en circunstancias silentes. **Bol. Div. Mal. San. Amb.** XVI (2): 119-125. 1976.
- [29] WEAVER, S.C.; HAGENBAUG, A.; BELLEW, L.A.; GOUSSET, L.; MALLAMPALLI, V.; HOLLAND, J.J.; SCOTT, T-W. Evolution of alphaviruses in the Eastern equine encephalomyelitis complex. **J. Virol.** 68:1158-169. 1994.
- [30] WEAVER, S.C.; SCOTT, T.W.; RICO-HESSE, R. Molecular Evolution of eastern equine encephalomyelitis virus in North America. **Virology** 182: 727-784. 1991
- [31] WHITE, A.; BERMAN, S.; LOWENTAL, J.P. Inactivated Eastern equine encephalomyelitis vaccines prepared in monolayers and concentrated suspension chick embryo cultures. **Appl Microbiol.** 21: 909-913. 1971.